

Universidad Autónoma de Madrid  
Programa de Doctora en Biociencias Moleculares

# **Caracterización de miR-127 como nuevo mediador de la fibrosis renal**

Laura Martín Gómez

Madrid, 2017



Departamento Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

# **Caracterización de miR-127 como nuevo mediador de la fibrosis renal**

TESIS DOCTORAL

Laura Martín Gómez

Graduada en Biología Sanitaria

Directora: María Laura García Bermejo

Codirector: Fernando Liaño García

Tutora: Pilar Rodríguez Pombo

Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS)

Hospital Ramón y Cajal (Madrid)

“Si hay algo en nosotros verdaderamente divino es la voluntad.  
Por ella afirmamos la personalidad, templamos el carácter, desafiamos la adversidad,  
reconstruimos el cerebro y nos superamos diariamente”

Santiago Ramón y Cajal

*A mis padres y Kuko,*

“Para comenzar, ¡comienza!” se propone desde el ámbito del Coaching, igual que se me propuso a mí en Febrero del 2013, cuando inmersa en el frío invierno alemán en medio de la experiencia Erasmus recibía la cálida propuesta de manos de la Dra. M<sup>a</sup> Laura García Bermejo de realizar en su grupo, la Tesis Doctoral que cuatro años después me encuentro escribiendo.

Por la confianza que depositó en mí, creyendo más en mí que yo misma, por sacar todo el potencial científico que yo me planteaba obviar, por su dedicación, cercanía, apoyo, por cada palabra y por tanto compartido... el primer agradecimiento no podía ser para otra persona. GRACIAS Laura, por darme la oportunidad de redactar cada una de las líneas de las siguientes páginas.

Soy de las que piensa que la vida nos pone a las personas en el camino, en el momento clave, tú eres un claro ejemplo. Con lo que, aquí, también merece la pena dar GRACIAS a Dios por el plan perfecto que tenía trazado para mí.

Dicho todo lo anterior, me gustaría recapitular un poco de mi experiencia a lo largo de estos cuatro años, de los que no sólo me llevo desarrollo profesional sino también un gran crecimiento intrapersonal e interpersonal, puesto que todos los conocimientos y aptitudes adquiridas, junto con el trato de todas las personas que de una manera u otra han estado presentes, me han hecho crecer, haciéndome ser hoy una persona diferente a la que era cuando comencé.

Por el Plan Bolonia en el que están enmarcados mis estudios universitarios, previo a la Tesis Doctoral, tenía que realizar un Master Oficial. En consenso con quien ya era mi jefa, me matriculé en el Master en Bioquímica, B<sup>a</sup> Molecular y Biomedicina de la Universidad Complutense de Madrid del cual obtuve un aprovechamiento académico excelente y una gran motivación para continuar los años siguientes con mi carrera investigadora.

Durante este tiempo compaginé estudio con trabajo en el laboratorio (más el resto de mis “mil y una cosas”) y aunque en muchas ocasiones se hizo duro, resultó ser mucho más llevadero por el Laboratorio (esta vez con mayúsculas) del que me habían permitido formar parte, al que la auto-denominación de “Integration Lab.” le viene *como anillo al dedo*.

En primer lugar mencionar a la Dra. Elia Aguado Fraile, y si se pueden contabilizar los GRACIAS, millones para ti, por ser un gran ejemplo a seguir y marcar como reto, la excelencia, dejando claro como buena “teacher” que sólo el esfuerzo, la dedicación y el trabajo consciente permiten conseguirla.

Dejándome, junto con su sitio en el despacho (que recuerdo perfectamente el día que lo hizo y cómo le costó deshacerse de él, y ahora lo entiendo) el título de “Padawan” (y que con el tiempo evolucionaría a “Padi”), se marchó a Estados Unidos para continuar su camino. Por el tiempo compartido, aunque corto, pero muy intenso y fundamental, mi mención especial en este apartado.

Llegados a este punto no sé si por lo de “joven” o por lo de “aprendiz” iba a necesitar de la presencia, apoyo y ayuda incondicional del resto del grupo, que aunque en número pueda ser pequeño, en esencia, es muy grande.

Dicen que “las chicas son guerreras” y así me lo han demostrado, GRACIAS a la Dra. Elisa Conde, Macarena Rodríguez y Edurne Ramos, incluso Lorena Crespo en los últimos meses, por asentarme entre todas, las bases tanto teóricas como prácticas de la investigación que queda recogida en esta Tesis. Quizás haya sido el “arte de birli birloque” o quizás el ambiente familiar que se percibe en nuestro espacio de la -3 izquierda del Hospital Ramón y Cajal y más delante de la 7 derecha, lo que nos ha llevado a vivir experiencias, risas, llantos y confesiones; no importa, lo que queda es todo lo compartido, puesto que... “Sólo aprende quien se emociona”. Así, cada cultivo celular, cada PCR, cada análisis estadístico, cada inmunohistoquímica, cada hibridación in situ, incluso los más “temidos” zimogramas o western blots, no los olvidaré nunca.

Obviamente no sólo han estado durante el tiempo del Master, sino hasta día de hoy. También para disfrutar de nuevas incorporaciones como Sara Giménez Moyano a quien he tenido la oportunidad de transmitir todo lo que he ido aprendiendo para que ella pueda continuar formándose en lo que siempre ha querido y en lo que espero ya no le queden dudas, de que si se lo propone, puede conseguir. GRACIAS Sara, porque “lo que no se da, se pierde” y con tus ganas de aprender de mí todo lo que te pudiera enseñar, has hecho que no se pierda nada.

A las chicas de Biobanco: Ana, Sonia, Bárbara y Paloma, que tan bien me acogieron cuando me vi obligada a cambiar de ubicación, haciendo posible que todo el trabajo previo, pudiera llegar a término. GRACIAS por hacer efectiva la frase “cuando menos te lo esperas, sale el sol”, creía en ella pero ahora lleva vuestra imagen.

Por la ayuda recibida desde otros centros de investigación, GRACIAS a Kostas, Marta Fierro y Manuel Fresno. Dentro del Hospital, un agradecimiento especial a las chicas de Micro: Ana (Rizos), Irene, Bea y Rosa del Campo por poner a mi disponibilidad sus equipos y ayuda, siempre con una sonrisa. También mencionacionar a doctores como: Fernando Liaño, Sara Giménez, Héctor Pian, Constantino Varona, Ana Saiz, Luis Miguel Rincón, Rocío Tapia, Victoria Gómez, Javier Burgos, Santiago Moreno y Alfredo Carrato. GRACIAS a ellos por sus aportaciones para la

realización de este trabajo, permitirme ampliar mi currículum y vivir de cerca la Medicina que siempre me ha generado tanta fascinación.

Y cierto es que, como una frase que le gustaba a Pilar (a quien también quisiera traer al apartado de los agradecimientos, por su acompañamiento desde el cielo): “Hay personas que permanecen por un tiempo, dejando huellas hermosas en nuestros corazones”. Así, en mi corazón, todas las mencionadas anteriormente junto con otras con las que he tenido la suerte de colaborar y poder compartir tiempo durante estos cuatro años.

Me gustaría continuar dando las GRACIAS a Juan Luis Álvarez Herradón, Juanlu, por ser un gran compañero en este viaje del que bien podría haber podido realizar su primera exposición de fotografía y con la que hubiera sido capaz de reflejar la templanza que sólo él sabe, pues como bien dicen, “la paciencia es la madre de la ciencia”. Sólo sintiéndole fan incondicional mío me ha hecho no decaer e incluso remontar en los momentos de máxima debilidad. Por tu asistencia informática, pero sobretodo y fundamentalmente moral, estas líneas son para ti, GRACIAS de todo corazón, por ser partícipe de un objetivo más de mi vida, marcado y cumplido.

GRACIAS también a “las 3 Marías”, *tita*, *shiatsu* y María Jesús, por su comprensión y dedicación. Porque con su asistencia y su energía han hecho que todo se haga más llevadero.

GRACIAS a mi familia con sus “¡tú sí que vales!” y amigos, entre los que destaco a: “los de la Universidad” con las quedadas liberadoras de la rutina diaria y entre ellos mención especial a Natalia y Adri por su ayuda en los últimos momentos donde todo es aún más duro y parece que nunca va a terminar...suerte que con su destreza en cuantificación de *westerns* y estadística, no han dejado lugar a la duda. “Las del Erasmus” con su asistencia vía Whatsapp recordando lo diferente que era la vida en Tübingen... ya lo dijo Karina, “cualquier tiempo pasado nos parece mejor” y “volver la vista atrás es bueno a veces”. Y a “las niñas”, Bea y Raquel, por su presencia clave en esta etapa de mi vida, haciendo que mi esfuerzo se multiplicara por tres al valorarlo como si de un “superpoder” se tratara.

GRACIAS a lo que yo llamo destino pero que según Melendi: “otros prefieren llamar casualidad”, por el regalo de quien me ha ayudado a conseguir una versión 2.0 de mi misma, transformando toda mi imaginación en realidad, aportando toda la fuerza y apoyo que semejante tarea requería. Gracias por la magia sin la que la recta final de esta etapa se me hubiera hecho demasiado cuesta arriba y que pase lo que pase estará para siempre entre mis recuerdos.

Por último, y no por ello menos importante, mi agradecimiento a quienes reciben la dedicación de esta Tesis, mis padres. GRACIAS Anabel Gómez, porque “madre no hay más que una” y a día de hoy estoy convencida de que la mía es la mejor. Sí, incluidos los momentos en los que la ansiedad ocasiona mal estar entre nosotras, me hace sentir todo el amor que me tiene y como “el amor es la entrega sin límites” según canta José Luis Perales, ella me ha dado todo lo que necesitaba para llegar donde he llegado. Me hace muy feliz saber tras esta experiencia, que lo seguiré haciendo donde quiera que me dirija de aquí en adelante. No falla en las decisiones importantes y en invitarme a luchar por ésta...tampoco lo hizo.

GRACIAS Antonio Martín, quien en varias ocasiones incluso ha sido galardonado como “el mejor padre del mundo”, por cada minuto al lado de ese pupitre rojo, que me hizo crecer en la constancia, el entusiasmo y el trabajo bien hecho y que nos lleva a disfrutar hoy, juntos, de la satisfacción que todo esfuerzo conlleva.

GRACIAS porque juntos habéis construido un proyecto durante muchos años que se podría decir, ha llegado a dar este resultado casi inimaginable, un título de Doctora que, por supuesto, lleva vuestra impronta.

A los que han sido nombrados y otros tantos que no, porque sino casi que necesitaría escribir otra tesis... ¡GRACIAS! Si algo pudiera compartir con vosotros, es una frase que me ha acompañado desde los primeros días de esta “aventura”. En la ciencia como en la vida...

“NO HAY FRACASOS, SÓLO RESULTADOS”.



Resumen

Está establecido que una gran parte de los pacientes que superan un Fracaso Renal Agudo (FRA) terminan por desarrollar Enfermedad Renal Crónica (ERC) a largo plazo. En relación con esta progresión, no hay disponibles en clínica biomarcadores cuantificables y precisos, que permitan hacer un seguimiento de estos pacientes y detectar en estadíos tempranos la ERC. De hecho y debido a la ausencia de biomarcadores, estos pacientes no han sido considerados de riesgo y normalmente no son sometidos a seguimiento exhaustivo.

Este trabajo se basa en resultados previos de nuestro grupo que ha identificado y patentado una combinación de miRNAs con capacidad diagnóstica de FRA en sueros de pacientes. Algunos de estos miRNAs permanecían alterados tras la resolución de FRA y por tanto valoramos su papel en el desarrollo de daño crónico, proponiendo como objetivo final identificar y validar miR-127, uno de los miRNAs que permanecen alterados, como un nuevo biomarcador pronóstico, diagnóstico e incluso como una nueva opción terapéutica de ERC. Para ello se han usado modelos experimentales in vitro (células epiteliales tubulares humanas y fibroblastos de rata), el modelo murino de Obstrucción Ureteral Unilateral (OUU) y biopsias y muestras de suero de pacientes con ERC establecida en distintos estadios.

El principal estímulo fibrótico descrito es TGF- $\beta$ , que a través de la cascada de señalización TGF- $\beta$ / Smad promueve la supervivencia y proliferación de fibroblastos, induce transición epitelio-mesénquima (TEM) de las células epiteliales, y permite el depósito y remodelado de la matriz extracelular (MEC), mediante la modulación de metaloproteinasas. Por ello, hemos utilizado en este trabajo un modelo de células epiteliales HK-2 tratadas con TGF- $\beta$ .

Como características fundamentales de la disfunción epitelial que contribuye a la fibrosis del riñón, observamos en células epiteliales tubulares proximales: pérdida de expresión de E-Cadherina, incremento de la expresión de  $\alpha$ -SMA, depósito de matriz extracelular como colágeno I y activación de metaloproteinasas (MMP-9 y 13). Todo ello es determinado en cultivos celulares de HK-2 tratados con TGF- $\beta$ . En los fibroblastos estudiamos la implicación de este miRNA en su activación y proliferación. Para estudiar el papel del miR-127-3p en este contexto, se modula in vitro, mediante la transfección de pre-miRs y anti-miRs.

Además, se determinan los niveles de los miRNAs de la combinación en el suero de pacientes, mediante qRT-PCR y se establecen correlaciones estadísticas con los datos clínicos de los mismos.

Todo lo mencionado previamente, nos lleva a caracterizar miR-127-3p como mediador de fibrosis renal y a proponerlo como biomarcador de ERC.

Summary

It is well established that a large proportion of patients who overcome an acute kidney injury (AKI) eventually develop chronic kidney disease (CKD) in the long term. So far, there are no quantifiable and accurate biomarkers to predict the evolution of AKI to CKD and detect the early stages of CKD. In fact, due to the absence of biomarkers, these patients have not been yet considered at risk and monitored.

This project is based on previous results of our group that had identified and patented a combination of miRNAs detected in serum of patients with AKI diagnostic value. Some of these miRNAs remained altered after AKI resolution and therefore the implication of these miRNAs in the evolution of AKI to CKD and their role in the development of chronic damage was assessed.

The main goal of this project is identify and validate miR-127, one of the miRNAs that remain altered after AKI, as a new prognostic biomarker, diagnosis and even as a new therapeutic option for CKD. For this, in vitro experimental models (human tubular epithelial cells and rat fibroblasts), murine UUO model and biopsies and serum samples from patients with established CKD at different stages have been used.

The major fibrotic stimulus described is TGF- $\beta$ , which through the TGF- $\beta$  / Smad signaling cascade promotes fibroblast survival and proliferation, induces epithelial-to-mesenchymal (TEM) transition from epithelial cells, and allows deposition and remodeling of the extracellular matrix (ECM), by the modulation of metalloproteinases. Therefore, we have used in this work a model of HK-2 epithelial cells treated with TGF- $\beta$ .

As a key features of epithelial dysfunction contributing to fibrosis of the kidney, we observed in proximal tubular epithelial cells: loss of E-Cadherin expression, increased expression of  $\alpha$ -SMA, deposition of extracellular matrix as collagen I and activation of metalloproteinases (MMP - 2, 9 and 13). All was determined in HK-2 cell cultures treated with TGF- $\beta$  and in which miR-127 had been modulated. On the other hand, the role of this miRNA in fibroblasts involves activation and proliferation as the modulation experiments demonstrate.

In addition, the levels of the miRNAs of the combination in the serum of patients is determined by qRT-PCR and statistical correlations are established with the clinical data.

Taking together all these results, we have unveiled miR-127-3p as a critical mediator of renal fibrosis and therefore potential biomarker and therapeutical approach in CKD

Índice

ABREVIATURAS.....	15
INTRODUCCIÓN.....	19
<b>1 Enfermedad Renal Crónica .....</b>	<b>21</b>
1.1 Definición .....	21
1.2 Clasificación.....	21
1.3 Epidemiología.....	22
1.4 Biomarcadores ERC: Definición y características .....	23
1.5 Manejo de la ERC y aproximaciones terapéuticas .....	23
<b>2 Transición Epitelio Mesénquima y fibrosis .....</b>	<b>24</b>
2.1 Fibrosis renal .....	24
2.2 Definición de TEM y sus mecanismos moleculares reguladores. ....	26
2.3 Regulación de TEM.....	28
<b>3 microRNAs .....</b>	<b>31</b>
3.1 Biogénesis.....	31
3.2 Regulación de la Biogénesis .....	34
3.3 Función.....	36
3.4 miRNAs en TEM y fibrosis.....	37
3.5 microRNAs como nuevos biomarcadores .....	38
3.6 miRNAs como nueva aproximación terapéutica en la ERC .....	40
En la realización de este trabajo se han utilizado las siguientes líneas celulares:.....	47
1.1 Tratamiento con TGF- $\beta$ .....	47
1.2 Modelo In Vitro de hipoxia/reoxigenación .....	47
1.3 Cultivos condicionados.....	48
<b>2 LISADOS CELULARES PARA EXTRACCIÓN DE PROTEINAS.....</b>	<b>48</b>
<b>3 WESTERN BLOT .....</b>	<b>48</b>
<b>4 MODULACIÓN DE MIRNAS MEDIANTE TRANSFECCIÓN DE PRE/ ANTI- miRNA EN CÉLULAS HK2 Y NRK-49F .....</b>	<b>49</b>
<b>5 ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA PARA VALORAR MIGRACIÓN CELULAR. ....</b>	<b>50</b>

6	INMUNOFLUORESCENCIA .....	50
7	ZIMOGRFÍA PARA ANÁLISIS DE ACTIVIDAD METALOPROTEINASA.....	51
8	SISTEMA DE DETECCIÓN MÚLTIPLE DE CITOQUINAS POR ARRAY DE ANTICUERPOS. <i>QUANTIBODY® HUMAN CYTOQUINE ARRAY</i> .....	51
9	DETECCIÓN DE TGF- $\beta$ EN SOBRENADANTES MEDIANTE ELISA.....	52
10	ENSAYO DE PINOCITOSIS.....	52
11	CLONAJE DE GENES Y ENSAYO DE LUCIFERASA .....	52
12	EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL EN CÉLULAS Y TEJIDOS.....	54
13	EXTRACCIÓN DE RNA DE MUESTRAS DE SUERO .....	54
	El RNA es almacenado a -80 ° C hasta su uso. ....	55
14	PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT Q-PCR): .....	55
14.1	Estudio de la expresión de genes.....	55
14.2	Estudio de la expresión de miRNAs.....	56
15	ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS .....	57
16	INMUNOHISTOQUÍMICA.....	57
17	HIBRIDACIÓN IN SITU DE miRNAs .....	58
18	MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i> .....	59
18.1	Animales.....	59
18.1.1	<b>Modelo <i>in vivo</i> de obstrucción ureteral unilateral (OUU)</b> .....	59
18.2	Muestras de pacientes de Enfermedad Renal Crónica .....	60
18.2.1	<b>Biopsias humanas</b> .....	60
18.2.2	<b>Muestras de suero de pacientes con ERC establecida</b> .....	60
19	ESTUDIO DE DIANAS PREDICHAS Y VALIDADAS DE miRNAs .....	61
20	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	61
	<b>RESULTADOS</b> .....	63
	TGF- $\beta$ induce TEM en células proximales tubulares y modula la expresión de miRNAs.....	65
	Modulación exógena de miR-127-3p en el modelo de TEM inducido por TGF- $\beta$ .....	73
	Predicción y validación de dianas de miR-127 en nuestro modelo. ....	76

Identificación de dianas de miR-127- 3p.....	78
Efecto de miR-127 sobre la migración de células epiteliales tubulares.....	80
Expresión y actividad metaloproteinasas asociada a la modulación de miR-127 .....	83
miR-127-3p regula también la TEM en hipoxia/ reoxigenación.....	85
Papel de miR-127 en el microambiente fibrótico: secreción de citoquinas y miRNAs .....	86
La modulación de miR-127- 3p en células epiteliales condiciona cultivos de fibroblastos .....	92
Efecto de la modulación de miR-127-3p en fibroblastos NRK-49F .....	95
Modelo murino de OUU para mimetizar daño renal crónico .....	99
miRNAs como biomarcadores de daño renal crónico en humanos.....	102
<b>Expresión de miRNAs en biopsias de pacientes transplantados .....</b>	<b>102</b>
<b>miRNAs como potenciales biomarcadores de ERC.....</b>	<b>105</b>
DISCUSIÓN.....	113
CONCLUSIONES.....	127
BIBLIOGRAFIA.....	131
ANEXO 1.....	149



## Abreviaturas

- **ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- **AGEs:** *Advanced glycation end products*
- **ANOVA:** Análisis de varianza
- **ARN:** Ácido ribonucleico
- **ARNm:** ARN mensajero
- **ARNPII:** ARN polimerasa II
- **AUC:** Area bajo la curva
- **BSA:** Albúmina de suero bovino
- **CAC:** Cociente Albumina/ Creatinina
- **cDNA:** DNA copia
- **Cq:** ciclo umbral
- **Crs:** Creatinina sérica
- **DAPI:** 4', 6- diamino-2 fenilindol
- **DAVID:** *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*
- **DEPC:** Dietilpirocarbonato
- **DM:** Diabetes Mellitus
- **DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- **dsRBPs:** proteínas de unión a ARN de doble hebra
- **DTT:** Ditiotreitól
- **EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- **EPIRCE:** Epidemiología de la Insuficiencia Renal Crónica en España
- **ERC:** Enfermedad Renal Crónica
- **ERRγ:** receptor gamma relacionado con estrógenos
- **ESRD:** Enfermedad Renal Crónica en Estadío Final
- **EXP5:** Exportina- 5
- **FBS:** Suero fetal bovino
- **FG:** Filtrado glomerular
- **FRA:** Fracaso Renal Agudo
- **GFAP:** proteína ácida fibrilar glial
- **GO:** *Gene ontology database*
- **H/R:** Hipoxia/ Reoxigenación.
- **HEPES:** Ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperacini]-etanosulfónico
- **HK-2:** Células de epitelio proximal tubular humano

- **hsa-miRNA:** *Homo sapiens* microRNA
- **HTA:** Hipertensión Arterial
- **I/R:** Isquemia/ Reperusión
- **IRA:** Insuficiencia Renal Aguda
- **K/DOQI :** *Kidney Disease Outcome Quality Initiative*
- **KDa:** kiloDalton
- **KDIGO:** *Kidney Disease Improving Global Outcomes*
- **KEGG:** *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database*
- **MAPK-4:** Proteína quinasa-4 activada por mitógenos
- **MEC:** Matriz Extracelular
- **miRNA:** microRNA
- **MMP:** Metaloproteínasa
- **MVB:** cuerpos multivesiculares
- **NKF:** *National Kidney Foundation*
- **NRK-49F:** fibroblastos renales de rata
- **NTA:** Necrosis tubular aguda
- **Nx:** Normoxia
- **OUU:** Obstrucción Ureteral Unilateral
- **PBS:** buffer fosfato salino
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **RISC:** Complejo inductor de silenciamiento de ARN
- **rno- miRNA:** *Rattus norvegicus* microRNA
- **ROC:** *Receiver-Operator Characteristic curve*
- **RT-qPCR:** PCR cuantitativa a tiempo real
- **SDS:** Dodecil sulfato sódico
- **SDS-PAGE:** Dodecil sulfato sódico- electroforesis en gel de poliacrilamida
- **SEN:** Sociedad Española de Nefrología
- **SNPs:** polimorfismo de un único nucleótido
- **TEM:** Transición epitelio mesénquima
- **TFG:** Tasa de filtración glomerular
- **TGF-β:** Factor de crecimiento tumoral-β
- **TNF-α:** Factor de necrosis tumoral- α
- **USRDS:** *United States Renal Data System*
- **UTR:** Región no transcrita
- **VFG:** Velocidad de Filtración Glomerular

# Introducción

## 1 Enfermedad Renal Crónica

### 1.1 Definición

Se define Enfermedad Renal Crónica, por parte de la National Kidney Foundation (NKF), como una alteración permanente e irreversible que afecta la estructura y función renal durante más de 3 meses, lo cual implica un filtrado glomerular inferior a 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> y presencia de anormalidades estructurales o funcionales del riñón, que pueden provocar potencialmente el descenso del filtrado glomerular (FG). De esta manera, se puede diagnosticar a un paciente de ERC con una tasa de filtración glomerular considerada normal (> 60 ml/min), si el individuo tiene daño renal estructural (imágenes) y/o funcional (albuminuria). Según la etiología, la estructura del riñón afectada (glomérulo, vasos, túbulos o intersticio renal), su severidad y el grado de progresión, la expresión clínica de esta patología varía.

La ERC empieza a ser clasificada y ordenada como entidad a partir de 2002 cuando se publicaron las guías K/DOQI (Kidney Disease Outcome Quality Initiative) en las cuales se recoge además de la definición detallada al inicio de este apartado, la evaluación y clasificación de la ERC basada en estadios de severidad, definidos por el filtrado glomerular (FG) junto con el diagnóstico clínico. La manifestación de la lesión renal se evidencia directamente por alteraciones histológicas en la biopsia renal (enfermedades glomerulares, vasculares, túbulo-intersticiales) o indirectamente por la presencia de albuminuria, alteraciones en el sedimento urinario, alteraciones hidroelectrolíticas o de otro tipo, secundarias a patología tubular, o a través de técnicas de imagen (Murray Patrick T. et al., 2014). La ERC se diferencia del fracaso renal agudo (FRA) por su duración superior a tres meses (Orozco B. Rodrigo, 2010).

### 1.2 Clasificación

La organización internacional, *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) estableció una clasificación de los pacientes con ERC en seis categorías teniendo en cuenta su deterioro funcional medido por el FG (Levey Andrew S, 2005). Posteriormente se refinó la clasificación en base al cociente albúmina urinaria/creatinina en orina (CAC) (Tabla1). El sistema KDIGO para la ERC permite graduar el riesgo de mortalidad global, mortalidad cardiovascular, necesidad de tratamiento renal sustitutivo, FRA y progresión de la enfermedad renal. En la tabla 1 los riesgos se identifican con el color. El menor corresponde al verde, “bajo riesgo” ya que si no hay datos de deterioro funcional renal, no se puede catalogar como ERC. Le siguen el amarillo, riesgo “moderadamente aumentado”, naranja “alto riesgo” y rojo “riesgo muy alto”.

Pronóstico de la ERC según el FG y la albuminuria: KDIGO 2012				Categorías por albuminuria, descripción e intervalo		
				A1	A2	A3
				Normal o aumento leve	Aumento moderado	Aumento grave
				< 30 mg/g < 3 mg/mmol	30-299 mg/g 3-29 mg/mmol	≥ 300 mg/g ≥ 30 mg/mmol
Categorías por FG, descripción y rango (ml/min/1,73 m <sup>2</sup> )	G1	Normal o alto	> 90			
	G2	Levemente disminuido	60-89			
	G3a	Descenso leve-moderado	45-59			
	G3b	Descenso moderado-grave	30-44			
	G4	Descenso grave	15-29			
	G5	Fallo renal	< 15			

**Tabla 1: Pronóstico de la ERC según el FG y la albuminuria: KDIGO 2012.** Cociente albúmina/creatinina: 1 mg/g = 0,113 mg/mmol. 30 mg/g (3,4 mg/mmol).

### 1.3 Epidemiología

La ERC es un problema sanitario de primer orden en todo el mundo. Su incidencia está aumentando, las comorbilidades que la acompañan, principalmente las cardiovasculares, contribuyen a la mortalidad de los pacientes afectos y el coste del tratamiento de los pacientes en estadio 5 (diálisis y trasplante renal) es elevadísimo (Mezzano Sergio A et al., 2005). En Europa, se ha detectado un incremento anual de ERC cercano al 5% y en Estados Unidos (datos del USRDS) se ha estimado la posibilidad de duplicar la población con ERC en una década.

Un estudio sobre Epidemiología de la Insuficiencia Renal Crónica en España (estudio EPIRCE) (Otero A et al., 2010) estableció que la prevalencia de la ERC en la población adulta española era del 10%, de los cuales un 6,8% se encontraban entre los estadios 3 y 5. En estos estadios la prevalencia aumentaba con la edad (3,3% entre 40-64 años y 21,4% para mayores de 64 años). Una distribución similar a la española se encontró en la población utilizada en el estudio sobre la *Modification of Diet in Renal Disease* con el que se calcularon las ecuaciones MDRD para estimar el filtrado glomerular (Levey AS et al., 1999; Stevens LA et al., 2007).

Determinadas patologías se acompañan de una mayor prevalencia de ERC. Así, en los pacientes seguidos en atención primaria con hipertensión arterial (HTA) o diabetes mellitus (DM) la prevalencia llegó al 35-40 %. En la actualidad, sólo en España, 25.057 pacientes están en diálisis y 25.852 con trasplante renal funcionante (Doc marco sobre ERC, 2015). Sin embargo, no todos los afectados por la ERC están diagnosticados. En nuestro país el 40 % tienen lo que se conoce como “enfermedad renal oculta” y la mayoría fallecerán, principalmente de problemas cardiovasculares, antes de entrar en un programa de diálisis. Por otro lado, a pesar de los avances técnicos del tratamiento, la supervivencia global evaluada para los pacientes en diálisis es de un 12,9% a los diez años. Esto es debido probablemente al hecho de que el 50% tiene una media de tres factores de riesgo cardiovascular y una gran comorbilidad asociada.

En base a todo lo anterior, la prevención de la ERC y el logro de un tratamiento eficaz que evite su progresión hacia los estadios finales de la enfermedad y la mortalidad asociada constituyen desafíos que deben abordas la Medicina y la investigación Biomédica.

#### 1.4 Biomarcadores ERC: Definición y características

Entendemos como biomarcador “una característica que es medida de forma objetiva y evaluada como indicador del proceso biológico normal, proceso patogénico o respuesta farmacológica a una intervención terapéutica” (Murray PT et al., 2014)

En el contexto de la fisiología renal los biomarcadores se pueden clasificar en indicadores de: i) cambios en la función renal (Cr sérica, cistatina C), con los que se puede estimar el filtrado glomerular (Levey AS et al., 2009), y ii) daño estructural renal, entre otros KIM-1, NGAL, L-FABP, IL-18 (Jimenez Tortosa MR et al., 2015). Entre todos los biomarcadores estudiados, no se ha encontrado ninguno que pueda ser utilizado como “gold Standard” en el diagnóstico de cambios en la ERC, debido a la limitada especificidad de todos los anteriores mencionados. Los considerados “bronce Standard” son la cifra de creatinina sérica y el flujo urinario.

En los últimos años, se han identificado diferentes moléculas generadas por los riñones dañados o que reflejan alteración de la función renal y que se podrían utilizar para determinar la naturaleza, magnitud y el lugar de la lesión. Éstas van desde proteínas liberadas por el riñón dañado hasta moléculas reguladas en respuesta a productos filtrados, reabsorbidos o secretados por el riñón, como proteínas, moléculas encapsuladas en exosomas o microRNAs. Entre las bondades que presentan estos nuevos biomarcadores destaca que se alteran antes que el nivel de creatinina.

La tendencia en la variación de los niveles de los biomarcadores se correlaciona con la severidad, pudiendo ser utilizados como predictores de inicio de diálisis, mortalidad o recuperación funcional renal (Gorostidi M et al., 2014).

El biomarcador ideal debe ser sensible, específico, precoz, no invasivo, predictivo, indicativo del lugar de la lesión, pronóstico y de bajo coste (Seijas M et al., 2014). Además, en el ámbito de la patología renal los biomarcadores también deberían ser útiles para distinguir una lesión renal aguda de una reagudización o de una ERC (Vishal S et al., 2008) y desde luego para poder predecir la progresión del daño hacia la cronicidad.

#### 1.5 Manejo de la ERC y aproximaciones terapéuticas

La definición de ERC y su clasificación en estadios facilita su detección precoz y manejo. Las estrategias se basan en la medición de la presión arterial, detección de albuminuria y estimación del FG mediante fórmulas basadas en la creatinina plasmática (Wienek et al., 2010). Los grupos

de mayor riesgo son los pacientes con diabetes mellitus, hipertensión arterial o historia familiar de nefropatía. El control glucémico y de presión arterial, especialmente mediante el bloqueo del sistema renina-angiotensina- aldosterona, son la base del tratamiento (James MT et al., 2010). La ERC, independiente del origen, es progresiva y pasa por los estadios que hemos comentado antes. La velocidad de progresión y la duración de cada etapa varia en cada paciente según unos factores de riesgo que incluyen la susceptibilidad individual, la edad (ancianos), el sexo (varones), hábitos y comorbilidades (cardiovascular, DM) entre otros. Los individuos que presentan factores de susceptibilidad o de iniciación son los que están en riesgo de desarrollar ERC; en ellos debe realizarse prevención primaria. Hay que detallar que la enfermedad renal puede progresar porque la patología causal no está controlada (ej. diabetes mal tratada) o por causas independientes (ej. hipertensión arterial no controlada; infecciones no tratadas). El control de estos factores es lo que se considera prevención secundaria de ERC (Orozco B. Rodrigo, 2010). La evaluación de los pacientes se inicia con una historia clínica y examen físico, dónde es importante detectar las posibles causas del daño renal y los elementos reversibles o tratables de progresión de ERC, el riesgo cardiovascular asociado, el uso de fármacos o sustancias nefrotóxicas (ej. AINES, ciertos antibióticos,...) o un mal control metabólico de la diabetes. Por otro lado, los exámenes de laboratorio deben incluir, además del FG y proteinuria, alteraciones en otras funciones renales como el estado hidroelectrolítico y ácido-base, la anemia condicionada por el descenso en la producción de eritropoyetina y el metabolismo mineral. Además del perfil lipídico otros factores de riesgo CV, tradicionales y no tradicionales, deben considerarse.

En resumen, el manejo de la ERC consiste en 7 puntos: tratar las causas específicas de la enfermedad renal, identificar y resolver las causas reversibles de daño renal, tratar los factores de progresión, manejar y controlar los factores de riesgo cardiovascular, evitar los nefrotóxicos, tratar las complicaciones urémicas y preparar al paciente para alguna técnica de sustitución renal (diálisis o trasplante) si fuese necesario (Mezzano Sergio A. et al., 2005).

## **2 Transición Epitelio Mesénquima y fibrosis**

### **2.1 Fibrosis renal**

En el contexto de enfermedad renal crónica, el deterioro progresivo del riñón se asocia a un reemplazo del tejido renal por tejido fibroso a diferentes niveles, involucrando una progresiva glomerulosclerosis, nefrosclerosis y fibrosis túbulo-intersticial, en la que hemos focalizado este trabajo y para el estudio de la cual se utilizan diferentes modelos de fibrosis: en animales el de obstrucción ureteral unilateral (OUU) y en células, el tratamiento con TGF- $\beta$ , entre otros.



En los pacientes, la pérdida nefronal, provoca respuestas adaptativas en las nefronas remanentes que conllevan hipertensión e hiperfiltración glomerular, paso de proteínas al espacio urinario con proteinuria, activación intrarrenal del sistema renina angiotensina (SRA), activación tubular con implicación túbulo-intersticial, transdiferenciación de células epiteliales tubulares a miofibroblastos y finalmente fibrosis del parénquima renal con pérdida definitiva de la función. La fibrosis se caracteriza principalmente por excesiva y patológica acumulación de matriz extracelular formada por colágeno I, III y IV, fibronectina y laminina entre otros. La acumulación de estas moléculas entre los túbulos y los capilares peritubulares impide la función normal de los túbulos de eliminación de toxinas mediante transporte celular, por lo que éstas se acumulan. La fibrosis se va expandiendo en el parénquima renal hasta que el riñón pierde su estructura y su función. (Potenta S et al., 2008; Kalluri R et al., 2009).

Diferentes estudios han caracterizado a los miofibroblastos como principales productores y remodeladores de matriz extracelular. Están localizados en el intersticio renal donde su cantidad se correlaciona con severidad de la fibrosis renal. Como se detalla a continuación, su origen y su fenotipo son diversos. Los fibroblastos y fibrocitos, son células que se encuentran en el espacio intersticial para mantener la integridad funcional del riñón y encargados de producir y mantener la matriz extracelular. Tras un daño tisular y para reparar el tejido, estas células se activan mediante citoquinas, factores de crecimiento y otros estímulos para producir colágeno y crear nuevo tejido conectivo, pero en el proceso de fibrosis se da una activación anormal de las mismas. Los pericitos son células estromales implicadas en la regulación de la permeabilidad de los capilares intersticiales, y estos, junto a las células endoteliales que los constituyen pueden sufrir un proceso de Transición Endotelio Mesénquima, constituyéndose como otra fuente adicional de miofibroblastos (Humphreys BD et al., 2010; 2012). Otro origen de miofibroblastos pueden ser las células derivadas de la médula ósea (BMDC) que migran al riñón en respuesta a un daño y allí se diferencian a miofibroblastos por los factores solubles del entorno. Y por último las células epiteliales tubulares en las que puede darse la transición epitelio mesénquima y en las cuales está centrado este trabajo (Pallet N. et al., 2008; Sun YB et al., 2016).

Como características de los miofibroblastos destacan la presencia de microfilamentos de actina, filamentos intermedios de vimentina, desmina, laminina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y las tubulinas  $\alpha$  y  $\beta$  de los microtúbulos. Los microfilamentos de actina se expresan en todos los tipos de células, todos los fibroblastos expresan las actinas F,  $\beta$  y  $\gamma$ , pero los miofibroblastos además de estas actinas expresan de manera muy importante la actina de músculo liso  $\alpha$ -SMA. A pesar de la importante presencia de la  $\alpha$ -SMA que caracteriza a los miofibroblastos, se ha intentado clasificarlos utilizando la presencia de otros dos filamentos intermedios, la vimentina y la desmina, la expresión de las cuales puede variar de acuerdo con las condiciones fisiopatológicas

del tejido estudiado, la especie y otros factores ambientales que participen (Ramos Abraham Carlos et al., 2004).

Además, desde hace algunos años se ha introducido el concepto de “proto-miofibroblasto”, definidos como fibroblastos que adquieren fibras de estrés, desarrollan adhesiones focales y sintetizan fibras de fibronectina pero no expresan  $\alpha$ -SMA. Esto podría ocurrir tras un daño inicial, por ejemplo cuando se da estrés del retículo endoplásmico en presencia de algún fármaco, independiente del TGF- $\beta$ , con el que las células proximales tubulares sufren una TEM parcial. Sólo en el caso en el que se mantenga un estímulo suficiente de TGF- $\beta$ , es cuando se produce la total diferenciación a miofibroblasto, caracterizándose por expresión de  $\alpha$ -SMA, síntesis de colágeno I y aumentando la expresión de fibronectina además de por la unión de fibras de estrés y adhesiones focales que llegan a ser más complejas (Pallet N. et al., 2008; Tomasek JJ. et al., 2002). Es entonces este cambio de fenotipo el que permitiría la contractilidad y la síntesis de gran cantidad de matriz extracelular y con ella la fibrosis del tejido.

## 2.2 Definición de TEM y sus mecanismos moleculares reguladores.

La Transición Epitelio Mesénquima ha sido estudiada en diferentes procesos como: desarrollo embrionario, cicatrización de heridas, fibrosis de órganos y metástasis. Según el que consideremos, se diferencian tres subtipos (Loeffler I et al., 2015; Kalluri R. et al., 2009): Tipo1, relacionada con la implantación, formación y desarrollo del embrión; tipo 2, relacionada con la fibrosis de los órganos, la regeneración de tejidos y la cicatrización de heridas y tipo 3, asociada a invasión y metástasis de células cancerígenas.

En esta transición está aceptado que las células epiteliales pierden la adhesión celular y su polaridad ya que disminuyen marcadores de adhesión como E- cadherina y adquieren otros mesenquimales como vimentina o  $\alpha$ -SMA (Iwano et al., 2002; Loeffler and Wolf, 2015; Zeisberg et al., 2008). Además hay mediadores y rutas de señalización claves que conducen a dicha transición como TGF- $\beta$ /Smads, interleuquinas, Wnt/ $\beta$ -catenina, Twist1 y Snail1, que son activados en el epitelio renal tubular tras un daño agudo. De ahí que se utilicen modelos *in vitro* de tratamiento con TGF- $\beta$  para inducción de TEM en cultivos celulares (Humphreys et al., 2010). En este proceso de transformación, las células implicadas pueden migrar a través de la matriz extracelular que las rodea. No obstante, no en todos los estudios de TEM se observan las mismas características ya que se puede dar una TEM parcial o una TEM incompleta con no adquisición de marcadores finales de TEM como  $\alpha$ -SMA (Sun YB et al., 2016).

Dentro de los mecanismos moleculares implicados en la transición epitelio mesénquima, la fibrosis y por lo tanto en la progresión de enfermedad renal crónica, es de destacar en primer

lugar la proteinuria persistente en los pacientes, que además de aumentar la angiotensina II, puede provocar una activación tubular de los factores de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y proteína activada 1 (AP-1), que a su vez participan en la transcripción de genes proinflamatorios (MCP-1, RANTES, osteopontina) y genes profibrogénicos (TGF- $\beta$ , PDGF). Todo ello conduciría a una reacción inflamatoria permanente en el tejido y fibrosis del intersticio (Mezzano SA. et al., 2005). Otro de los elementos importantes en este contexto es el colágeno, que deriva en gran parte de la transdiferenciación o cambio fenotípico de las células epiteliales tubulares a células mesenquimáticas miofibroblásticas, inducido principalmente por TGF- $\beta$  (Mezzano SA et al., 2001).

Las rutas que más se han relacionado con el proceso de TEM son TGF- $\beta$ /Smads, Wnt/ $\beta$ -catenin, JNK/STAT3, and MAPKs. La primera es la más caracterizada para diferentes modelos de daño renal, según ésta, TGF- $\beta$ 1 se une TGF- $\beta$ 2R y se inician las cascadas de señalización dependientes e independientes de Smad con las consecuentes fosforilaciones y final translocación de Smad 2/3 junto con Smad 4 al núcleo para modular la transcripción de diferentes genes diana. Así, TGF-  $\beta$ 1 promueve una progresiva fibrosis renal mediante estimulación de síntesis de matriz extracelular, previniendo su degradación con la modulación de actividad metaloproteinasa y mediando la transición epitelio y endotelio-mesénquima (Yu et al., 2007; Sun et al., 2013; Maarouf et al., 2015; Lim et al., 2009). Esta señalización se ha demostrado con la sobreexpresión de TGF-  $\beta$ 1 (Lee, 2012) pero en otros casos en los que se ha disminuido o suprimido la actividad de su receptor, no se revierte el efecto, con lo que se puede inferir que otras moléculas como: AGEs, TNF- $\alpha$ , PDGF, MAPK, ROS y quimioquinas, también están implicadas en la fibrogénesis. Es un complejo mecanismo celular con interacciones entre rutas lo que contribuye a la fibrosis, por ejemplo, en el caso de la inhibición de Smad 4, disminuye la producción de matriz extracelular pero aumenta la activación de otro conocido estímulo profibrótico, NF- $\kappa$ B (Neelisetty et al., 2015; Lan Hui-Yao, 2012).

Puesto que el presente trabajo está centrado principalmente en el mecanismo de TEM que se da en el epitelio proximal tubular, se detallan en este apartado los mecanismos moleculares implicados en la misma, donde tienen destacada importancia los factores de transcripción como Snail (Snail1) y Slug (Snail2) que inhiben la expresión de E- Cadherina a través de su unión al promotor de CDH1. (Peinado et al., 2004; Yang et al., 2004; Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). También, ZEB 1, ZEB 2 y Twist, modificando el primero de ellos la histona H3 e impidiendo la unión de la ARN polimerasa II al promotor de CDH1 por su interacción con la Sirtuina 1 deacetilasa (Chen IC et al., 2014). Incluso, pueden promover la TEM al margen de la modulación de la E-cadherina, induciendo la disociación de uniones adherentes suprimiendo moléculas como la placofilina-2 y ZO-3 (Eger et al., 2005; Vandewalle et al., 2005). Otros factores de

transcripción como LEF-1 y TCF también podrían estar implicados inhibiendo la E-cadherina (Nawshad A et al., 2003).

En el mecanismo de TEM como se ha detallado anteriormente, también es importante la regulación de  $\alpha$ -SMA como marcador mesenquimal y las metaloproteinasas, entre las que destacamos en este trabajo la 9 (Gelatinasa B) y la 13 (Colagenasa 3) por su expresión e importancia en el remodelado de la matriz extracelular en el tejido renal (Wang X et al., 2010; Zou XZ et al., 2016; Sakamaki Y et al., 2010). En el caso de ser una TEM mediada por TGF- $\beta$ , se ha visto que la modulación de  $\alpha$ -SMA y la MMP9 está directamente mediada por la ruta de la  $\beta$ -catenina (Taiyab A et al., 2016). La disminución de la E-cadherina interrumpe el complejo que forma con la  $\beta$ -catenina y aumenta la  $\beta$ -catenina en el citosol formando complejo con CBP que se transloca al núcleo y aumenta la transcripción de los genes de  $\alpha$ -SMA y MMP 9 además de interaccionar con Smad 3 y promover la actividad transcripcional del factor *myocardin-related transcription factor* (MRTF), principal factor de la regulación de los genes del citoesqueleto durante la TEM en células epiteliales tubulares (Charbonney E et al., 2011). La modulación de estas moléculas correlacionan con el establecimiento de la fibrosis en el tejido además de por todo lo descrito para  $\alpha$ -SMA en el apartado anterior, por los estudio en los que se ha demostrado que la falta de MMP-9 protege de tal fenómeno en los modelos de OUU, por su capacidad de activación del TGF- $\beta$  tras ruptura proteolítica de su forma latente (Yu Q et al., 2010). MMP13 se ha demostrado que está implicada en la liberación del receptor de superficie de NF $\kappa$ B, además de estar descrita como diana potencial del miR-127-3p, molécula central de este trabajo (Zigrino P et al., 2009; Huang SH et al., 2016).

No obstante, otros estudios sugieren que las MMPs pueden ser tanto beneficiosas como perjudiciales en función del estadio de la enfermedad y además son específicas del factor desencadenante de TEM. Así, podría aumentar la cantidad de MMP en el tejido, haciendo que las células lleven a cabo la transición epitelio-mesénquima o mediando la producción de MMPs por parte del epitelio transicionado (Zeisberg M et al., 2006; Ronco P et al., 2008; Evette S. et al 2010).

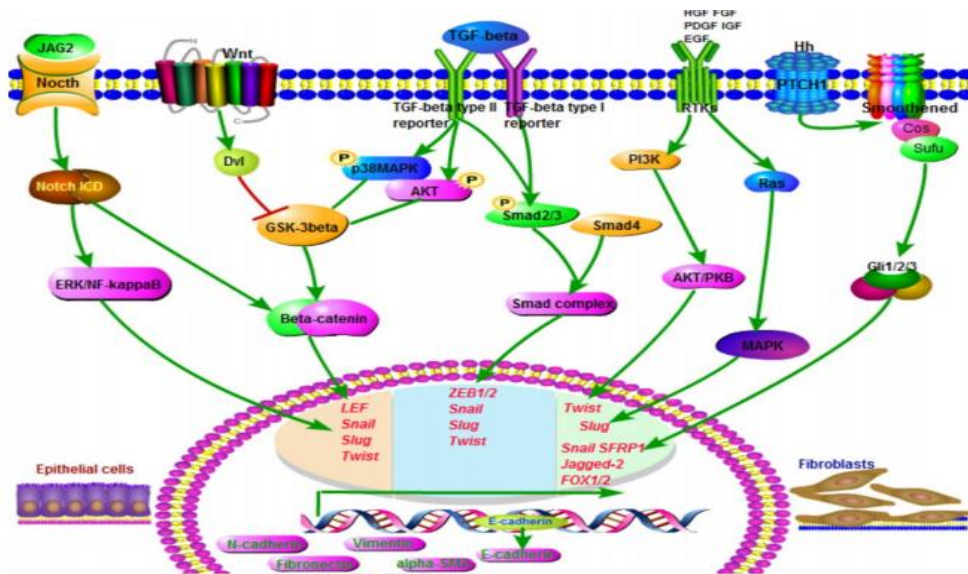
Tanto el mecanismo de fibrogénesis, como el modelo exacto de TEM que tiene lugar durante el daño renal crónico, no están caracterizados completamente. Sería útil determinar todos los factores implicados en el proceso para poder diseñar nuevas dianas terapéuticas que impidan o reviertan la fibrosis y con ella el daño renal crónico.

### 2.3 Regulación de TEM

El mecanismo de transición epitelio mesénquima está regulado por diferentes vías de señalización (figura 1). Como ya se ha mencionado previamente, TGF- $\beta$  es uno de los principales

estímulos desencadenantes del proceso. Se conocen tres isoformas de esta molécula (TGF- $\beta$ 1, 2 y 3) y 6 isoformas de BMP (BMP2 hasta BMP7), en la superfamilia de ligandos del receptor de TGF- $\beta$ . Todas ellas pueden activar la vía de señalización de TGF- $\beta$ . No obstante, es la isoforma TGF- $\beta$ 1 la que se ha observado que está involucrada en la mayoría de procesos fibróticos (Derynck R. et al., 2001). Para activar la vía de señalización los ligandos han de unirse al receptor de superficie TGF- $\beta$  tipo II, que recluta y fosforila con su actividad quinasa al receptor tipo I, para que este a su vez lo haga con Smad 2 y 3 (R-Smads) y que lleguen a constituir un complejo con un co-activador, Smad 4. En caso de que se establezca el complejo, éste pasa al núcleo donde se une a regiones regulatorias de genes asociados a TEM. Por ejemplo, Snail o ZEB que suprimen la expresión de E-cadherina (Peinado H et al., 2004). Por el contrario, inhibidores de Smad como Smad 6 y 7 (I-Smad) podrían unirse al receptor tipo I de TGF- $\beta$  con la consecuente inhibición de la señalización intracelular. Otras moléculas como el receptor tipo III de TGF- $\beta$  puede modular la afinidad de la unión de los ligandos en las células epiteliales y endoteliales.

Otras rutas que pueden inducir TEM son las que implican a Wnt, Notch, y Hedgehog. En el caso de la ruta de Wnt no se degrada la  $\beta$ -catenina que se transloca al núcleo y regula la expresión de sus genes diana, sobre todo a través del factor de transcripción LEF (Hwang SY et al., 2016). En relación a Notch, su ruta implica Snail, Slug y otras rutas y moléculas indirectamente como NF- $\kappa$ B y  $\beta$ -catenina (Kopan, 2002; Miele et al., 2006; Yang et al., 2011). Y la ruta Sonic Hedgehog (Hh) promoviendo la transcripción de genes diana como PTCH1, Wnt, y Snail, induce TEM activando la familia de factores de transcripción Gli (Li et al., 2006; Taipale J et al., 2001). Incluso, otros factores de crecimiento que desencadenan señalización mediada por receptores tirosina quinasa, activan rutas en las que están implicadas Ras, PI3K, Src, y ILK. Todas estas cascadas de señalización terminan involucrando factores de transcripción como Snail/Slug, ZEB1/2 y Twist, que como ya se ha detallado con anterioridad, están directamente implicados en la expresión de genes asociados a TEM (Gonzalez et al., 2014).



**Figura 1: TEM tipo 2. Señalización que tiene lugar en las células epiteliales para la regulación del proceso de transición a mesénquima.** Zou XZ et al., 2016.

Dentro del contexto de fibrosis, además de la TEM, también hay otro punto importante de regulación, como es el establecimiento de los miofibroblastos en el tejido y el remodelado del mismo que estos llevan a cabo, independientemente de su origen (Tomasek JJ et al., 2002).

En este contexto, intervienen las metaloproteinasas (MMPs) un tipo u otro en función de los componentes presentes en la matriz extracelular en cuestión. Por ejemplo la combinación de MMP3, MMP2 y MMP9 actúa para degradar proteoglicanos y proteínas no colaginosas.

No obstante no se conoce muy bien como es la regulación de este proceso. Algunos de los mecanismos propuestos se detallan a continuación. Vía de la p38 quinasa activada por mitógenos (MAPK, ERK1 y ERK2), que estimulan o inhiben la expresión de las MMP dependiendo del tipo celular. Muchas señales extracelulares y vías de transducción de señales convergen en el factor de transcripción AP-1 cuyo sitio de unión se encuentra en la región promotora de la mayor parte de los genes MMP. AP1 consiste en miembros de la familia de oncoproteínas FOS y JUN, que proporcionan un mecanismo general para la *trans*-activación de la expresión de las MMP en tumores malignos (Puente XS et al., 2005; Nakamoto T et al., 2000). Otros factores nucleares controlan la expresión de las MMP. Estos son, la familia de oncoproteínas ETS, que se unen a sitios PEA3 presentes en los promotores de los genes *MMP*. El factor nuclear kappa B (NFkB), que induce la expresión de las MMP-1, 3, 9, 13 y 14. Los transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT), que median los efectos de los interferones (IFN) sobre la expresión de los genes MMP o incluso la proteína p53, que modula la transcripción de MMP-1, 2 y 13.

Teniendo en cuenta la complejidad de la regulación y desarrollo de la fibrosis como base de la enfermedad renal crónica, además de todas las moléculas que ya se han detallado, se ha propuesto la participación de diferentes microRNAs en la fibrosis renal, tanto por su implicación en el mecanismo de transición epitelio mesénquima como en la señalización del TGF- $\beta$  y por su importancia en el mantenimiento y homeostasis de los diferentes tipos celulares involucrados en la fibrogénesis del tejido.

### 3 microRNAs

#### 3.1 Biogénesis

En las células eucariotas se han encontrado diferentes tipos de ARN pequeños, que se definen por su longitud de 20-30 nucleótidos y su asociación con proteínas de la familia Argonauta (AGO). En el reino animal, se clasifican en tres clases: microRNA (miRNA), siRNA and *PIWI-interacting RNA* (piRNA), siendo los primeros los más predominantes y objeto de estudio en este trabajo.

Los microRNAs son pequeñas moléculas de RNA (20-25 nucleótidos) endógenas las cuales regulan post-transcripcionalmente la expresión de genes y de esta manera numerosos procesos celulares en organismos eucariotas. Muchos están expresados a nivel celular y tejido específicos o estado de desarrollo específico, regulando la expresión de un perfil específico de mensajeros y proteínas en cada caso (Minju Ha et al., 2014).

Actualmente según se recoge en la base de datos miRbase ([http://www.mirbase.org/cgi-bin/1881\\_mirna\\_summary.pl?org=hsa](http://www.mirbase.org/cgi-bin/1881_mirna_summary.pl?org=hsa)) habría identificadas 1881 secuencias de miRNAs asociadas a humanos y bastante conservadas en organismos eucariotas. Se expresan a lo largo del genoma en posiciones intragénicas e intergénicas. Tradicionalmente se ha propuesto que los miRNAs son procesados por ARN polimerasa II (ARNPII) a partir de la transcripción de genes o de intrones de genes que codifican para proteínas (Saikumar J et al., 2014).

Para la generación de miRNAs en la ruta canónica, el proceso que da lugar al primer precursor (pri-miRNA) se da en dos pasos en los que, en mamíferos, intervienen dos RNasas III, Drosha y Dicer, en combinación con *dsRNA-binding proteins* (dsRBPs), como *DiGeorge syndrome critical region 8* (DGCR8) y *transactivation-responsive RNA-binding protein* (TRBP), respectivamente (Krol J et al., 2010). En el primer paso, el complejo Drosha–DGCR8, al que se asocian dos *DEAD-box RNA helicasas* (p68 (DDX5) y p72 (DDX17)) (Janani Saikumar et al., 2014) como proteínas de soporte para reclutar cofactores, procesa el pri-miRNA en un precursor de unos 70 nucleótidos (pre-miRNA), que será exportado al citoplasma mediante RAN-GTP y Exportina-5 (EXP5). Por otro lado, algunos pre-miRNAs son generados desde un intrón pequeño (*miRtrons*) a través de



mecanismos de procesamiento alternativo no existiendo el paso por Drosha– DGCR8. No obstante en ambos casos actúa Dicer, asistido por TRBP, en el citoplasma para la obtención de un dúplex miRNA/miRNA\* de unas 20-bp.

En mamíferos, la proteína argonauta 2 (AGO2), la cual tiene una potente actividad endonucleasa, puede colaborar con Dicer en el procesamiento, cortando el extremo 3' de algún pre-miRNAs, constituyéndose como un procesamiento intermedio que genera otro precursor llamado *AGO2-cleaved precursor miRNA* (ac-pre-miRNA). Siguiendo con el proceso, una de las hebras del dúplex, llamada “pasajera” o “miRNA\*” es degradada mientras que la hebra llamada “guía”, por regla general, es incorporada al complejo RISC, constituyéndose el *miRNA-induced silencing complex* (miRISC), cuyos componentes principales pertenecen a la familia Argonauta (Ago1-4). Generalmente, la hebra que pasa a formar parte del complejo es la que tiene un par de bases menos estable en el extremo 5' del duplex miRNA/miRNA\*. No obstante la hebra miRNA\* podría tener funcionalidad como miRNA.

En caso de que haya una perfecta complementariedad, entre el miRNA y el ARNm diana, como sucede en el caso de los miRNAs de las plantas, se da una degradación endonucleolítica catalizada por Ago2 (Rybak A et al., 2009). Mientras que en el caso de los animales donde la complementariedad entre el miRNA y el mensajero es sólo parcial, se da una represión de la traducción en el paso de la iniciación o después de la misma o deadenilación para marcar al ARNm para su degradación exonucleolítica. Los ARNm que están adenilados o reprimidos en el paso inicial de la traducción por haber sido reconocidos por miRNAs, se acumulan en los *P-bodies* para su degradación o almacenamiento.

A pesar de todo lo descrito anteriormente, la biogénesis de miRNAs aún no está totalmente caracterizada, por lo que en los estudios más recientes, se proponen mecanismos de biogénesis en los cuales se dan modificaciones en el procesado de los precursores y reciclado de miRNAs. Este hecho es conveniente desde un punto de vista celular ya que no sería necesario generar una nueva molécula de mRNA para obtener un nuevo precursor.

Se sigue manteniendo que la biogénesis de los miRNAs puede darse por dos rutas, la canónica y no canónica, pero se hace una mejor caracterización de ambas. En la ruta canónica que es la que se describe en los párrafos anteriores, se añade especificaciones como: Drosha se conoce también como RNASEN, la biogénesis puede darse a través de un promotor específico del miRNA o como parte del gen en el que se encuentra, normalmente cercano a regiones intrónicas. Además algunos pueden transcribirse como un *cluster de miRNAs* si se localizan muy cerca en el genoma y la hebra seleccionada para el complejo RISC se ha visto que está asociada a diferentes tipos celulares y estados de desarrollo (Biasiolo M et al., 2011).



Es en el caso de la ruta no canónica en la que ha emergido nuevo conocimiento en generación de miRNAs, según el cual, las moléculas involucradas coincidirían con las de la ruta canónica, pero el origen genómico difiere, en este caso, hay que tener en cuenta que algunos miRNAs están localizados en regiones intragénicas. En concreto, un miRNA que deriva de un loci intratranscrito, es conocido como mirtron. Se genera como una horquilla de doble hebra igual que los miRNAs convencionales pero es procesado por la maquinaria del complejo de procesamiento para constituirse como pre-miRNA. Este es un mecanismo DROSHA/DGCR8 independiente y a partir de aquí el procesamiento continúa la vía canónica. El concepto mirtron descrito tradicionalmente en la ruta no canónica, se relaciona con pre-miRNAs generados tras el proceso de *splicing* de un ARNm. Pero no en todos los pre-mirtrons los extremos coinciden con los extremos del intrón, con lo que hay un procesamiento adicional. Una variante de los mirtron son los simtrons, dependientes del complejo de procesamiento pero independientes de Drosha. Incluso se han descrito otros orígenes de los miRNAs como algunos ARN nucleolares pequeños o ARN transferentes.

Una vez generados, los miRNAs pueden ser secretados al medio extracelular con las consecuentes implicaciones funcionales y permitiéndoles ser detectados en fluidos corporales libres de células, como la orina o el suero (Février B et al., 2004). Son secretados encapsulados en exosomas (10–100 nm) y microvesículas (0.1–1  $\mu$ m) o cuerpos apoptóticos (0.5–2  $\mu$ m) en el caso de proceder de células que han sufrido apoptosis, o unidos a HDL o proteínas del complejo RISC. Este encapsulamiento les confiere una alta resistencia a la degradación por RNAsas (Saikumar J et al., 2014). Aunque la vida media de los miRNAs secretados no se conoce exactamente, sí parece que persisten durante un largo tiempo gracias a la estabilidad de los complejos lipoproteicos en los que están incluidos. Para ser eliminados en los fluidos, podrían hacerlo por rutas de degradación específicas, filtrado renal o por el sistema hepático (Weber JA et al., 2010). Todo esto, les hace susceptibles de ser caracterizados como potenciales biomarcadores de diferentes enfermedades en las que pueda estar alterado su patrón de expresión (Saikumar J. et al., 2014).

En este trabajo hemos caracterizado la funcionalidad de miR-127 en el contexto de daño renal crónico. Este miRNA está localizado en la región cromosómica 14q32.2, agrupado con miR-433. El primer transcrito de ambos está controlado por la señalización mediada por el receptor nuclear de *small heterodimer partner* (SHP) y por *estrogen related receptor gamma* (ERR $\gamma$ ). En diferentes estudios se ha relacionado miR-127 con desarrollo fetal e inflamación en el pulmón (Bhaskaran et al., 2009; Xie et al., 2012), con proliferación celular en células de hígado de rata (Pan et al., 2012) y con carcinomas de esófago, tiroides, vejiga y glioblastoma. Por otro lado, miR-127 se ha descrito en relación con la nefrogénesis y el carcinoma de células renales

(Gomez IG et al., 2016) y aunque en este órgano, sí se ha estudiado la implicación de otros miRNAs en relación a la fibrosis renal, hasta ahora no hay nada descrito de la implicación de miR-127 en la TEM subyacente a la fibrosis que caracteriza la ERC.

### 3.2 Regulación de la Biogénesis

Los miRNAs son moléculas reguladoras y su biogénesis también es un proceso altamente regulado mediante interacciones entre proteínas y proteínas con RNA (Krol J et al., 2010). Se presenta de manera esquemática en la figura 2

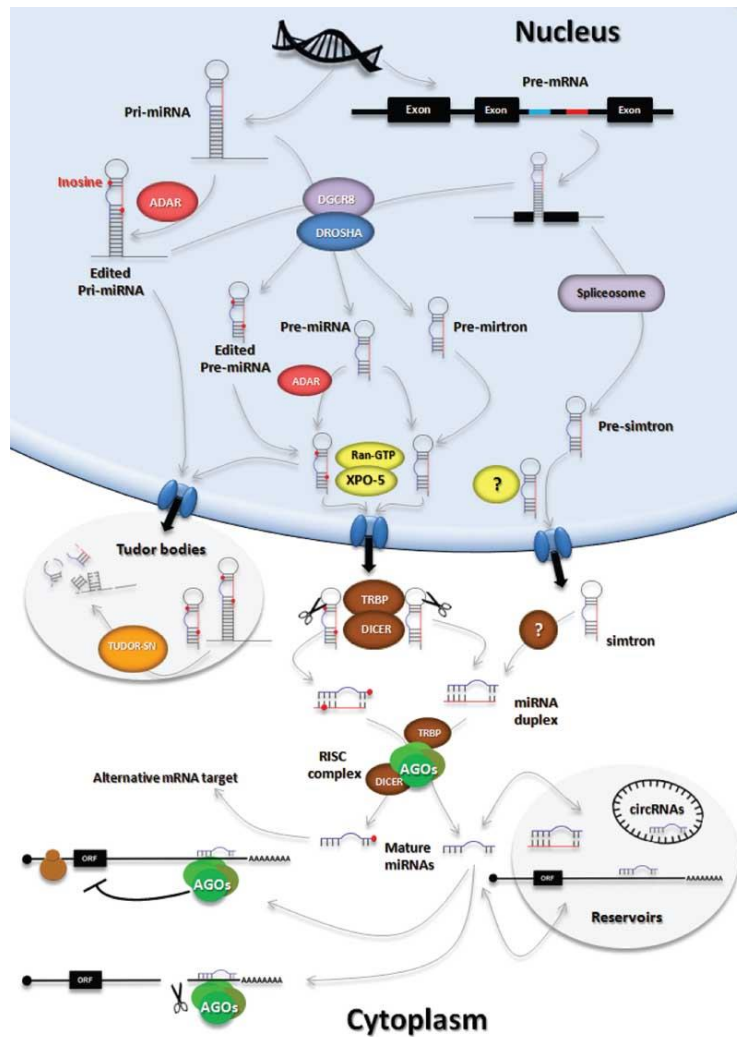
El principal mecanismo regulatorio de la generación de miRNAs, actúa a tres niveles: uno durante la transcripción de los pri-miRNAs, el segundo en el mecanismo de edición que pueden sufrir los precursores y el tercero sobre la maquinaria de procesamiento como el complejo DROSHA/DGCR8 o DICER (Suárez Y et al., 2009). Respecto al primero se sabe que es mediante factores de transcripción que son específicos de tipo celular y responden a estímulos ambientales o son necesarios para desencadenar mecanismos de desarrollo (García-López Jesús et al., 2013). Por ejemplo los factores de transcripción OCT4 y SOX2 que están implicados en el mantenimiento de células madre, regulan la transcripción del *cluster* mmu-miR-302. Otro ejemplo es la regulación de la transcripción de pri-miRNA-34 por la proteína p53, cuando ésta es activada en respuesta a un daño. MiR- 127, objeto de estudio de nuestro trabajo, está regulado, entre otros, por el factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  y por ello se induce en respuesta a isquemia (Aguado-Fraile et al., 2012). Además la metilación de los promotores de los miRNAs puede afectar su expresión, estando asociados patrones erróneos de hipermetilación a patologías como cáncer. Así, la biogénesis de los miRNAs implicaría también regulación epigenética (Wang Z et al., 2011).

En relación a la edición que pueden sufrir los pre-miRNAs consideramos las proteínas ADAR. Son adenosinas desaminasas que actúan sobre ARN de doble cadena modificando la secuencia de nucleótidos. Así, con la desaminación de las adenosinas se transforman en inosinas reconocidas por la célula como guanosina aunque a veces puede disturbar el reconocimiento y por tanto la unión del pri y pre- miRNA a DROSHA/DGCR8 y DICER. Esto se describió por primera vez en el miR-22 (Luciano DJ et al., 2004). Cuando la edición afecta a la secuencia de unión del miRNA al ARNm se produce un fenómeno conocido como “retargeting” (Garcia-Lopez J et al., 2013; Vesely C et al., 2012). Por otro lado, la actividad de DROSHA/DGCR8 y DICER puede estar regulada, por ejemplo, mediante la unión de la ribonucleoproteína hnRNPA1 a la región de unión del pri-microRNA-18a facilitando su procesamiento por DROSHA/DGCR8. O en el caso de la proteína ERK mediando la fosforilación de TRBP, estabilizando la unión del pre-miRNA con DICER y aumentando así la eficiencia del procesamiento (Paroo Z et al., 2009). Un último ejemplo de

regulación de la biogénesis dentro de lo conocido hasta el momento, es la que afecta a la generación de let-7, en el que interviene la proteína LIN28 que reprime tanto el procesamiento de pri- como el del pre- miRNA y mediante feedback, let-7 también regula la traducción del ARNm de Lin28 (Shyh-Chang N, et al., 2013).

En relación a la generación de los miRNAs algunos estudios demuestran que la falta de nueva biogénesis en caso de que esté ausente la maquinaria encargada de ella, no implica la falta del miRNA, como es en el caso de mmu-miR-292-3p y mmu-miR-292-5p. Estos miRNAs podrían estar preservados como moléculas de doble cadena (heteroduplex) con la unión a los ARNm diana (en el caso de que el miRNA sólo esté inhibiendo la traducción y no degrade el mensajero), pseudogenes, dúplex de hebras pasajeras u otros tipos de reservorios específicos de ARN (Garcia-Lopez J et al., 2012). Estos reservorios también tienen la capacidad de capturar moléculas de miRNA maduro inhibiendo así su actividad. Algunos de estos reservorios son moléculas de ARN circular (circRNAs) que podrían actuar como “esponjas” de miRNAs, donde son almacenados hasta su nuevo uso (Hansen TB et al., 2013). Además, la edición de los miRNAs podría desencadenar su eliminación vía *Tudor staphylococcal nuclease* (TUDOR), ya que esta enzima reconoce la Inosina (Scadden AD, 2005). No se sabe cuántos cambios de una base por otra son necesarios para que los miRNAs puedan ser regulados por esta vía, pero sí se ha descrito que la eliminación se lleva a cabo en determinadas zonas del citoplasma llamadas *T-bodie* (Garcia-Lopez J et al., 2013)

Los pre-miRNAs pueden dar lugar a más de una secuencia madura debido a sustituciones, inserciones o deleciones. Los miRNAs así generados se denominan isomiRs. En un principio se consideraban artefactos pero se ha demostrado que incluso pueden llegar a unirse con el ARNm y son específicos de células y tejidos, de acuerdo al contexto biológico en el que se encuentren (Neilsen CT et al., 2012).



**Fig 2: Biogénesis, degradación, almacenamiento y reciclaje de miRNAs.** Garcia-Lopez J et al., 2013

Es importante tener en cuenta la existencia de todas las modificaciones y variables que se pueden presentar en el proceso de generación de los miRNAs, ya que en algunos casos se relacionan con la regulación de su propia biogénesis, pero en otros puede verse afectada la función del microRNA.

### 3.3 Función

Como ya se ha mencionado previamente, la función de los miRNAs es ejercer una regulación postranscripcional, la cual consiste en un silenciamiento de los ARN mensajeros diana. En este proceso la función de los miRNAs es actuar como guía para aparear bases de su secuencia con las del ARNm, para que las proteínas efectoras AGO puedan reclutar diferentes cofactores y llevar a cabo la represión de la traducción.

Los sitios de unión de los miRNAs a sus dianas están localizados generalmente en *3' untranslated region* (UTR) del ARNm. El dominio terminal 5' del miRNA, que va desde el nucleótido 2 al 7 ("*seed sequence*") es fundamental para el reconocimiento del mensajero diana. También tiene

especial importancia el nucleótido 8 y algo menos los que ocupan la posición 13 a 16 (Huntzinger E et al., 2011). Se ha predicho que más del 60% de los genes que codifican para proteínas en humanos contienen al menos una secuencia conservada de unión a miRNAs y teniendo en cuenta que existen otros sitios de unión no conservados, se puede considerar que la mayoría de los genes pueden estar controlados por miRNAs (García-López J. et al., 2013).

Cada miRNA puede reconocer unos 100-200 sitios diana en el transcriptoma, por lo que el número de interacciones miRNA-mRNA es muy amplio. Además se pueden detectar miRNAs alternativos con *single-nucleotide polymorphism* (SNPs), poliadenilaciones o productos de splicing alternativo (Bartel DP., 2009; Friedman, RC et al., 2009). Aunque la función que desempeñan los miRNAs es la misma en cuanto a ser reguladores negativos de la expresión de sus mensajeros diana, según sobre los que actúen y en el contexto que lo hagan así tendrán una u otra implicación funcional final. En este trabajo caracterizamos el papel y la funcionalidad que tienen algunos miRNAs, en particular miR-127 en el riñón, órgano para el que los miRNAs son fundamentales en el desarrollo, homeostasis y fisiología (Trionfini P et al., 2015).

### 3.4 miRNAs en TEM y fibrosis

Se ha demostrado la implicación de miRNAs en el proceso de TEM en diferentes contextos fisiológicos, como la fibrosis de órganos sólidos, incluido la fibrosis renal (Chen W et al., 2016). Los miRNAs son importantes en la fibrosis renal ya que diferentes aproximaciones experimentales han probado que la ausencia de su maquinaria de biogénesis desencadena dicho proceso afectando, por ejemplo, la producción de moléculas proinflamatorias implicadas en fibrosis como es el caso de miR-9 con NFκB y miR-23a con la IL-17 (Huang X et al., 2016; Hu J et al., 2017).

Considerando el TGF-β1 como estímulo principal tanto para la TEM como para la fibrosis, se ha demostrado que éste regula el perfil de miRNAs, a nivel transcripcional a través de Smads que se translocan al núcleo, o a nivel post-traducciona mediante asociación directa con la secuencia conservada dentro del pri-miRNA. La manera en la que los miRNAs median las acciones de TGF-β son dependientes del tipo celular y del contexto.

Por otro lado, los miRNAs pueden regular genes implicados en la formación de la matriz extracelular como el gen de colágeno I al inhibir Zeb1 y Zeb2 que son represores del gen. Así se ha demostrado que actúa el miR-192 (Kato M et al., 2007; Putta S et al., 2012). En caso de que el miRNA esté *down-regulado* disminuiría la expresión de la E-Cadherina y transicionaría el epitelio, mientras que estando elevado aumentaría la expresión de E-Cadherina por inhibir los represores de la transcripción de este gen, Zeb 1 y 2. Otros miRNAs como el miR-29 tiene efecto antifibrótico y en este caso el TGF-β1 actúa inhibiendo su expresión, ya que dicho miRNA

disminuye la expresión de colágeno, fibronectina y laminina (Wang B et al., 2012). En las células epiteliales tubulares, también se ha demostrado que TGF- $\beta$ 1 disminuye la expresión de miR-30e, lo que resulta en un aumento de UCP2, una proteína transportadoras de aniones que regula la producción de ATP mitocondrial. Esta desregulación disminuye la generación de ATP y lleva a fibrosis renal (Jiang L et al., 2013). Por otro lado se ha demostrado que miR-21 promueve TEM en células epiteliales y modula la función de las células mesangiales, en las que al actuar sobre su diana Smad7 permite la amplificación de la señal de TGF- $\beta$ 1 en modelos murinos de diabetes tipo 2 (Zhong X et al., 2013; Wang JY et al., 2013). Otros estudios demuestran diferentes efectos para la familia let-7 en células tubulares proximales humanas, en las que algunos de los genes diana de estos miRNAs como TGF $\beta$ R1, COL1A1 y COL1A2 disminuyen y por tanto, la presencia de let-7 atenúa la fibrosis renal (Li R et al., 2013).

Como ya hemos mencionado previamente en este trabajo, otras de las moléculas importantes en un contexto fibrótico son las metaloproteinasas y también ellas pueden ser reguladas por miRNAs. Por ejemplo se ha demostrado que miR-379-5p disminuye la expresión de MMP2 y MMP-9 y que el miRNA-340, al inhibir el factor de transcripción STAT3 que activa genes como Bcl-2, ciclina D1 y MMP2, también tiene efecto inhibitor sobre ésta, disminuyéndose como consecuencia, la proliferación y la migración celular (Chen JS et al., 2016; Yuan J et al., 2016). También miR-21 regula la fibrosis renal disminuyendo la cantidad de MMP9 y aumentando TIMP-1, inhibidor de la metaloproteinasas (Zhao Y et al., 2016; Tan TK, et al., 2013; Zheng G et al., 2009).

Finalmente mencionar que miR-127, objeto de nuestro estudio de este trabajo se ha demostrado que es regulador de moléculas ya descritas asociadas a TEM y fibrosis (Vega G et al., 2016). TGF $\beta$  inhibe la transcripción de miR-127 mediante la activación de c-Jun a través de la señalización de ERK y JNK contrarrestando así su aparente activación por p53 según se ha demostrado en carcinoma hepatocelular. Incluso se ha demostrado que una disminución de miR-127 podría activar TGF $\beta$ . Así mismo se relaciona miR-127 con la supresión de la migración celular desencadenada por TGF $\beta$  inhibiendo MMP13 (Yang Z, et al., 2013).

### 3.5 microRNAs como nuevos biomarcadores

Un biomarcador ideal debería poder ser detectado de forma no invasiva, ser preciso y poder ser estimado de forma reproducible en las muestras disponibles. Además debería tener alta sensibilidad con una notable diferencia entre muestras patológicas y sujetos sanos o con distintos estadios de la enfermedad (Neal CS et al., 2011). Los miRNAs maduros poseen algunas de estas características, que los convierte en potenciales herramientas diagnósticas y pronósticas (Trionfini P et al., 2015). Son moléculas de secuencia corta, fácilmente detectables

y con potencial determinación en diferentes fluidos corporales como: plasma, suero, saliva, orina, líquido amniótico, leche materna, líquido seminal y lágrimas (Ramachandran K et al., 2013).

Diferentes miRNAs ya han sido descritos como potenciales biomarcadores diagnóstico de diferentes tipos de cáncer y marcadores tempranos de eventos patológicos como el infarto agudo de miocardio (Cortez M et al., 2009; Mitchell PS et al., 2008; Wang GK, et al., 2010). En el contexto renal, los miRNAs en suero se han propuesto, por nuestro grupo y otros, para ser utilizados como diagnóstico de Fracaso Renal Agudo (FRA) (Aguado- Fraile et al., 2015) y diferentes estudios los han identificado también en orina, asociados a daño renal agudo en pacientes de cuidados intensivos. En modelos experimentales animales, se han descrito como mediadores en respuesta a un daño renal generado por diferentes estímulos detectándose también en sangre (Bellinger MA et al., 2014; Lee CG et al., 2014). No obstante, nuevos marcadores son necesarios para el diagnóstico y la monitorización de la progresión de pacientes con ERC, para mejorar la estratificación de los pacientes o el riesgo de determinadas complicaciones (Ramachandran K et al., 2013).

En relación con lo detallado previamente, se proponen los miRNAs como biomarcadores en la patología renal, basándonos también en su uso previo en otras como el cáncer, donde correlacionan los niveles de miRNAs circulantes con la presencia de tumores sólidos (Schwarzenbach H. et al., 2014). En la mayoría de los casos, cuando se valoran los miRNAs en los fluidos, se tiende a medir una combinación de estos y no uno de forma aislada, posiblemente en relación a las nuevas asociaciones de célula/ tejido enriquecido en ciertos miRNAs (Bellinger MA et al., 2014).

Para su valoración en diferentes muestras, Neal et al. fue de los primeros trabajos en que se usó la técnica de RT-qPCR para medir la expresión de miRNAs en pacientes con diferentes estadios de ERC pero la falta de algún gen con el que normalizar los datos hacía difícil la interpretación. El uso de *spike-in*, una secuencia exógena, o un perfil de miRNAs que no varían su expresión en las muestras analizadas, pueden corregir esta problemática. Además, no sólo se pueden establecer los miRNAs como biomarcadores de diferentes estadios de ERC sino para pronóstico de desarrollo de complicaciones asociadas a ella, en relación a lo cual aún no hay muchos estudios, proponiéndose el de V. Metzinger-Le Meuth et al. 2017, como pionero. No obstante, para llegar a establecer los miRNAs como biomarcadores de uso en el ámbito clínico, es extremadamente importante la estandarización de las técnicas de medición así como el tipo y la recogida de muestras. Por ejemplo el plasma heparinizado o el suero hemolizado no es útil para la medición por qPCR, puesto que se inhibe la ADN polimerasa. Lo ideal sería combinar los miRNAs con otros biomarcadores ya existentes con demostrado valor diagnóstico, generándose

algoritmos y normogramas, que están siendo ya validados en otras patologías (Schultz NA et al., 2014).

### 3.6 miRNAs como nueva aproximación terapéutica en la ERC

Se ha descrito la implicación de los miRNAs en el daño renal crónico mediante diferentes modelos experimentales. Así, la desregulación de miR-126, miR-143, miR-145 y miR-223 se asocia a un daño de las células de músculo liso vasculares (VSMCs) (Metzinger-Le Meuth V et al., 2017). Y los niveles de miR-21 se correlacionan con la fibrosis intersticial y atrofia tubular en los pacientes trasplantados (Glowacki F et al., 2013). Dado que los miRNAs son mediadores fundamentales en los mecanismos fisiopatológicos de enfermedad, se ha propuesto la modulación de los mismos como una posible aproximación terapéutica a determinadas patologías (Calvopina DA et al., 2016), incluida la fibrosis renal, al menos a nivel de modelos experimentales (Long J et al., 2011).

La modulación de los miRNAs podría ser una aproximación terapéutica para los pacientes con ERC. Habría que considerar la posible degradación del ARN exógeno por las nucleasas del suero o del tejido o incluso por los macrófagos; el posible fallo al atravesar el endotelio capilar o la matriz extracelular e incluso la ineficiente endocitosis por las células dianas. No obstante, el uso de inhibidores de miRNAs ya ha sido utilizado en humanos para disminuir la carga del virus de la Hepatitis C, silenciando el miR-122 (*Miravirsen*) (Janssen HL et al., 2013). Y están en marcha ensayos clínicos para la sobreexpresión de miRNAs como el miR-16 en hombres mayores de 50 años con mesotelioma pleural maligno. Para dichas modulaciones de los miRNAs se emplean secuencias antagónicas (antimiRs) o premiRNAs, respectivamente (Cortez M et al., 2009). Aunque el mecanismo de acción ya está ampliamente descrito, las formas de administración terapéutica son el reto del futuro. Se ha propuesto el uso de *nanomateriales* y vehiculizadores de miRNAs ya presentes en el cuerpo humano como las microvesículas o las HDL. Otra aproximación para la administración de moduladores de miRNAs es el uso de virus diseñados para terapia génica como los lentivirus o adenovirus o partículas de oro de unos  $13 \pm 1$  nm que incluyan los moduladores y se introduzcan en las células según la ruta endocítica (Bernardo B.C. et al., 2015). E incluso el sistema de editado de genoma, CRISPR/Casp9, que ya ha sido utilizado para el silenciamiento de miRNAs en líneas celulares humanas (Zhao Y et al., 2014).



## Hipótesis y Objetivos

El desarrollo de ERC implica atrofia tubular y fibrosis intersticial, progresivas, que resultan en un deterioro de la estructura y función renales, llevando a los pacientes a la necesidad de Terapia Renal Sustitutiva (diálisis o trasplante renal) en los estadios más avanzados.

Hasta el momento se dispone de escasas herramientas terapéuticas eficaces que frenen la progresión del daño renal crónico o incluso puedan revertirlo. Esto es debido, entre otras razones, al diagnóstico tardío de la enfermedad, que reduce las opciones de intervención, y a todas las complicaciones sistémicas asociadas a esta patología.

Por otro lado, se han estudiado los miRNAs como nuevos reguladores de la fibrosis en órganos sólidos, por estar implicados en mecanismos desencadenados en este contexto como la transición epitelio- mesénquima, mecanismo observado, en el caso del riñón, en células epiteliales tubulares, en presencia de un estímulo profibrótico como TGF- $\beta$ . Además, por su implicación en mecanismos fisiopatológicos de enfermedades, se han propuesto como potenciales dianas de actuación terapéutica. Prueba de ello es la puesta en marcha de ensayos clínicos administrando sus moduladores.

En nuestro laboratorio hemos identificado una combinación de miRNAs séricos como biomarcadores diagnóstico de daño renal agudo, que puede permanecer alterada después de que la creatinina indique que se ha recuperado la función renal. Por ello, estos miRNAs nos podrían aportar información sobre la evolución de los pacientes y la posibilidad de que estos progresen a una enfermedad renal crónica.

Entre los miRNAs de la combinación identificada, se encuentra miR-127, el cual proponemos que, entre otros mecanismos, puede ser un regulador clave de las alteraciones a nivel tubular y en el microambiente intersticial que se observan en el desarrollo progresivo de la ERC. Así, la modulación selectiva de miR-127 permitiría reducir la pérdida de características epiteliales en el túbulo, controlar la proliferación y activación de fibroblastos en el intersticio e incluso promover una polarización de macrófagos favorable en el parénquima renal.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, miR-127 o alguno de sus genes diana, podrían ser considerados como potenciales nuevas dianas de acción terapéutica en el daño renal crónico.

Para confirmar o desechar nuestra hipótesis de trabajo nos proponemos, como objetivo general de este proyecto, caracterizar el papel de miR-127 en el desarrollo del daño renal crónico y determinar el efecto de su modulación, en modelos experimentales in vitro (cultivos celulares) y modelos experimentales in vivo (modelo murino de OUU).

Además, determinaremos miR-127 en suero de una cohorte de pacientes de ERC de distinta severidad y en biopsias renales con diferente grado de fibrosis, para determinar la utilidad de miR-127 como biomarcador de ERC.

Como objetivos concretos del estudio proponemos:

- 1) Determinar la expresión de los miRNAs de la combinación y de los genes asociados a TEM en el modelo de células epiteliales tubulares tratadas con TGF $\beta$ .
- 2) Caracterizar la función de miR-127 en la TEM inducida por TGF $\beta$  en células tubulares proximales humanas, HK2, modulando el miRNA con pre-miR y anti-miR e identificar genes dianas de miR-127 en este modelo experimental.
- 3) Caracterizar la función de miR-127 en fibroblastos valorando sus efectos sobre la proliferación y la activación de estas células.
- 4) Determinar el efecto de modular miR-127 en un modelo murino de ERC, el UUO estructural y funcionalmente.
- 5) Determinar la expresión y localización de mir-127 en biopsias humanas y suero de pacientes de ERC y establecer correlaciones con los datos clínicos disponibles.

Los resultados derivados de este trabajo, constituirán una buena parte del estudio preclínico necesario para el diseño y realización, en el futuro, de un ensayo clínico de terapia basada en miR-127 para ERC.

## Materiales y métodos

## 1 CULTIVOS CELULARES

En la realización de este trabajo se han utilizado las siguientes líneas celulares:

- HK2: Células epiteliales tubulares proximales de riñón humanas. Se cultivan en medio DMEM-F12, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina-glutamina y 1 % de una mezcla de Insulina-Transferrina-Selenio.
- NRK-49F: Fibroblastos de riñón de rata. Secultivan en medio DMEM 1X, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina-glutamina y 1% de aminoácidos no esenciales.

Se mantienen en un incubador regular para cultivo celular con 5% de CO<sub>2</sub> a una temperatura de 37°C y en atmósfera húmeda.

### 1.1 Tratamiento con TGF- $\beta$

Todas las líneas celulares se cultivan en su respectivo medio pero sin suero 24 horas antes de ser tratadas con TGF- $\beta$ . Las concentraciones de uso que se han testado para el tratamiento fueron 1, 2.5, 5 y 10 ng. Se genera un stock de 20  $\mu$ g/ml, tras activación de TGF- $\beta$  en pH ácido utilizando 4 mM HCl.

### 1.2 Modelo In Vitro de hipoxia/reoxigenación

Para desarrollar una parte inicial de este trabajo, se utiliza un modelo de hipoxia/ reoxigenación (H/R) puesto a punto en nuestro laboratorio (Sáenz-Morales y col., 2006) que mimetiza el daño del epitelio proximal del riñón que se produce en la I/R *in vivo*, consecuencia tanto de la falta de oxígeno como de nutrientes.

Siguiendo este modelo, las células se cultivan en medio completo hasta que llegan a 80-90 % de confluencia y posteriormente se incuban 24h en medio sin suero, para inducirles un estado de quiescencia. Transcurrido este tiempo se cambia el medio de las células que iban a ser sometidas a hipoxia por medio HBSS con antibióticos y se mantienen las células durante 6 horas en un incubador de hipoxia a 37°C, perfundido con una mezcla de gases de oxígeno (1%), nitrógeno (94%) y CO<sub>2</sub> (5%) (Air Liquide). Para el periodo de reoxigenación las células se vuelven a introducir en un incubador regular, en medio completo y se mantienen en estas condiciones durante diferentes tiempos de reoxigenación que van de 24 a 120 horas, en los que se realizan las distintas determinaciones experimentales.

Tras el protocolo de H/R las células se lavan dos veces con PBS frío y se congelan rápidamente a -80°C para la posterior extracción de proteínas y de RNA.

### 1.3 Cultivos condicionados

Fibroblastos normales de riñón de rata (NRK-49F) se cultivan con los sobrenadantes recogidos de células HK-2 en los que se había modulado miR-127. Para ello, se retira el medio que contenían los cultivos de NRK-49F, y se añade 1 ml de sobrenadantes correspondientes a las distintas condiciones de modulación de miR-127 (Pre-miR- 127; Pre-*Scrambled*; Anti-miR-127; Anti-*Scrambled*) por cada pocillo de placa 6 *wells*. Se complementa con FBS y aminoácidos esenciales en las condiciones optimizadas para las NRK-49 F. El cultivo en medio condicionado se mantiene en un incubador regular para cultivo celular, a una temperatura de 37°C y en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> hasta 72 h.

## 2 LISADOS CELULARES PARA EXTRACCIÓN DE PROTEINAS

La extracción de proteínas se realiza mediante raspado de la placa de cultivo con Buffer Laemli sin SDS que contiene: 0,25 M Tris pH 6,8, 10% Glicerol, 20 mM DTT, 0, 01% Bromofenol Blue y posteriormente se añade en la misma proporción Buffer Laemli con 6% SDS, ambos suplementados con inhibidores de proteasas: 10 µg/ml Leupeptina, 10 µg/ml Aprotinina, 1 mM Perfabloc e inhibidores de fosfatasa: 1 mM fluoruro sódico y 1 mM de ortovanadato sódico.

Se homogenizan bien las muestras con ayuda de una jeringa y se sonicán 2 veces durante 5 min. Se centrifugan los Eppendorf a 15000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para precipitar los insolubles. Se recolecta el sobrenadante en el cual están contenidas las proteínas para almacenarlos a -80° C.

## 3 WESTERN BLOT

En un paso previo al desarrollo de esta técnica, se cuantifica la cantidad de proteína de las diferentes condiciones de los cultivos de HK-2 usando la técnica colorimétrica de Bradford. Se realiza una curva patrón de BSA, utilizando 5 µL de muestra para cuantificación a 595 D.O en un espectrofotómetro de absorbancia (Multiskan GO, Thermo Fisher).

Para el Western Blot se separan 60 µL de proteínas total en geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida (Biorad) electroforéticamente y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham), en una cubeta de transferencia húmeda (Bio- Rad). Las membranas se incuban en una solución de bloqueo (5% de leche en polvo) durante una hora a temperatura ambiente y después se lavan 3 veces durante 5 minutos. Tras esto las membranas son incubadas con los

correspondientes anticuerpos primarios en TBS, a diluciones adecuadas, durante toda la noche en cámara fría. Se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween y se incuban con el anticuerpo secundario fluorescente correspondiente, a temperatura ambiente durante una hora en agitación y oscuridad. Para terminar se realizan otros 3 lavados de 5 minutos con TBS- Tween antes de visualizar el resultado con lector de fluorescencia (Odyssey).

ANTICUERPO	Especie	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
<b>Anti <math>\alpha</math>-SMA</b>	Mouse	Abcam	1/200
<b>Anti <math>\beta</math>-Actina</b>	Mouse	Sigma	1/1000
<b>Anti E-cadherina</b>	Rabbit	Cell Signaling	1/500
<b>Anti MMP9</b>	Rabbit	Cell Signaling	1/100
<b>Anti MMP13</b>	Rabbit	Abcam	1/100
<b>Anti Snail</b>	Rabbit	Cell Signaling	1/500
<b>Anti Slug</b>	Rabbit	Cell Signaling	1/500

**Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados.**

#### 4 MODULACIÓN DE MIRNAS MEDIANTE TRANSFECCIÓN DE PRE/ ANTI-miRNA EN CÉLULAS HK2 Y NRK-49F

Para la modulación de miRNAs se transfectan las células HK-2 y NRK-49F al 70-80% de confluencia con 100 nM y 50 nM respectivamente anti-miR-127 (AM17000, Anti-miR<sup>TM</sup> miRNA Inhibitor, Life Technologies) y anti-miR-*Scrambled* (Anti-miR<sup>TM</sup> miRNA Inhibitors-negative Control #1, Life Technologies) y 0,1 nM Pre-miR-127 (AM17100, Pre-miR<sup>TM</sup> miRNA Precursor Molecule, Life Technologies) y Pre-miR-*Scrambled* (AM17110 Pre-miR<sup>TM</sup> miRNA Precursor Molecules- Negative Control #1, Life Technologies). Las concentraciones finales de Pre-miR y anti-miR se escogen haciendo controles y testando la expresión de miR-127 por qRT-PCR y Anti-miR qRT-PCR por su gen diana KIF3b (Aguado Fraile et al. Plos One).

Para la transfección se utiliza Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

El miRNA y la Lipofectamina se diluyen por separado en medio sin suero Optimem (Gibco). Se añade la lipofectamina sobre el miRNA diluido, para que se formen los complejos de transfección, y se incuban a temperatura ambiente durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, las células se incuban con los complejos de transfección durante 5 horas. Tras ello se

añade medio específico de la línea celular hasta completar el volumen de la placa. Al día siguiente se añade medio completo o se realizan dos lavados de las placas con PBS y se añade medio libre de FBS en caso de Hipoxia/ Reoxigenación o tratamiento con TGF- $\beta$  respectivamente. La modulación del miRNA se confirma mediante qRT-PCR.

## 5 ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA PARA VALORAR MIGRACIÓN CELULAR.

En placas de 6 pocillos se realiza la transfección de HK- 2 según el protocolo detallado en el apartado anterior. Al día siguiente se sustituye el medio de transfección por medio sin FBS o medio completo según se vaya a añadir el tratamiento de TGF-  $\beta$  o no, respectivamente. Pasado un mínimo de 4 horas se añade TGF-  $\beta$  en una concentración final de 5 ng/ mL y al día siguiente, pasadas 48 horas de la transfección y 24 horas del tratamiento, se efectúan dos rayas paralelas en cada pocillo, con ayuda de una punta de pipeta de 1 mL, quedando la monocapa interrumpida (herida) para valoración de la migración celular en cada una de las condiciones de cultivo. Se suplementa con TGF- $\beta$  cada día hasta la recogida del cultivo, y a punto final del tratamiento se toman muestras del medio, se lavan las placas un par de veces con PBS y se almacenan las células en las placas a -80 °C.

## 6 INMUNOFLUORESCENCIA

Para determinar la expresión y distribución de proteínas asociadas al proceso de transición epitelio mesénquima mediante inmunofluorescencia, se cultivan HK-2 sobre cubre objetos tratados con colágeno IV (1  $\mu$ g/mL. Sigma-Aldrich).

Para la determinación de  $\alpha$ -SMA (Abcam), E-Cadherina (BD) y MMP-13 (Abcam) las células son fijadas en 4 % de paraformaldehído durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se permeabilizan con 1% Tritón X-100 (Sigma Aldrich), se bloquea en 1 % de PBS/BSA (Sigma-Aldrich) durante 1 hora y se incuban con los anticuerpos primarios detallados previamente diluidos 1:100 en PBS/BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras esto se hacen 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS para después incubar durante 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario apropiado *anti-rabbit Alexa 486* o *anti-mouse Alexa 568* (Santa Cruz) diluidos 1:250. Después de lavar, las muestras son montadas con Prolong Gold Antifade/ DAPI y las imágenes son obtenidas con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE2000-U con cámara Nikon Digital Sight incorporada y procesadas con el software NIS-Elements BR 3.1



## 7 ZIMOGRAFÍA PARA ANÁLISIS DE ACTIVIDAD METALOPROTEINASA

La actividad metaloproteinasa de las células en cultivo y tratamiento, se determina en los sobrenadantes, que son recogidos después de la transfección y el tratamiento con TGF- $\beta$  y guardados a -80 °C.

Para el zimograma se combina el sobrenadante con Buffer Laemli 6% SDS en proporción 1:1 y se carga en un gel de 10% poliacrilamida para electroforesis (PAGE) con 0,1 % gelatina (Sigma-Aldrich).

Para la activación propia de la actividad metaloproteinas se incuban 100uL de sobrenadantes con 4  $\mu$ g (2 $\mu$ l) de Tripsina a 37 °C durante 15 min y después se añade el doble de volumen de FBS durante 10- 15 min a 37 °C. Tras esto se añade el buffer Laemli y después de 10 minutos a temperatura ambiente se cargan las muestras en el gel.

Una vez terminada la electroforesis se lavan los geles un par de veces a temperatura ambiente con 2.5% Triton X-100, durante media hora. A continuación se hace un lavado con buffer de revelado 1 X que contiene 50mM, Tris 50mM Tris-HCl, 0,2M NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, Tween 0,02% en agua y después se incuba con este mismo buffer a 37 °C durante 24 h.

Los geles se tiñen con 0.5% Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Finalmente, para visualizar las bandas de digestión de la gelatina por parte de las metaloproteinasas, se incuban los geles durante 1 hora a temperatura ambiente, con una solución de destinción. Las imágenes son tomadas con el sistema ChemiDoc MP Imaging System (BioRad) y analizadas con el Software ImageLab.

## 8 SISTEMA DE DETECCIÓN MÚLTIPLE DE CITOQUINAS POR ARRAY DE ANTICUERPOS. *QUANTIBODY® HUMAN CYTOKINE ARRAY.*

Para identificar citoquinas y otras moléculas implicadas en un proceso inflamatorio presentes en sobrenadantes de células HK-2 transfectadas con Pre-miRs y Anti-miRs, se escoge un sistema de detección múltiple: “Quantibody® Human Cytokine Array 1” (RayBiotech), que contiene anticuerpos para las siguientes moléculas: IL-1 $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ ; IL-2; IL-4; IL-5; IL-6; IL-8; IL-10; IL-12p70; IL-13; GM-CSF; interferon (IFN)- $\gamma$ ; *Monocyte Chemoattractant Protein* (MCP)-1; *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP)- 1 $\alpha$ ; MIP-1 $\beta$ ; *Matrix Metalloproteinase* (MMP)-9; *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted* (RANTES); *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- $\alpha$ ; *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF); Growth Related Oncogen (GRO).

El ensayo se basa en un método de ELISA, con anticuerpos adsorbidos a la placa y doble sándwich con anticuerpo secundario biotinilado y estreptavidina marcada con Cy3. Los resultados del array son analizados con el software apropiado suplementado por la casa comercial, y posteriormente los datos son procesados con Microsoft Excel y CurveExpert 1.4

## 9 DETECCIÓN DE TGF- $\beta$ EN SOBRENADANTES MEDIANTE ELISA.

La secreción de TGF- $\beta$  por parte de las células epiteliales tubulares proximales humanas bajo las diferentes condiciones de transfección, son analizadas mediante técnica de ELISA utilizando el kit *Human TGF- $\beta$ 1 ELISA Kit* (Ref: 650.010.096, Diaclone), siguiendo las instrucciones del mismo. El anticuerpo anti- TGF- $\beta$  humano, está adsorbido al fondo de cada uno de los pocillos y tras una primera incubación, el TGF- $\beta$  que hay en el sobrenadante se une a dicho anticuerpo. Después de varios lavados se añade un anticuerpo conjugado biotinilado que reconoce el TGF- $\beta$  unido al anticuerpo primario y después de otros lavados se incuba con estreptavidina-HRP que emite señal según la cantidad que se haya fijado y reaccione con la solución sustrato. El resultado se determina por espectrofotometría de absorbancia con una doble longitud de onda 450 nm y 630 nm, en un espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Fisher).

Para el análisis de los resultados se tiene en cuenta la absorbancia del blanco y se utiliza el software CurveExpert 1.4 para generar la recta patrón e interpolar los resultados de absorbancia y transformarla en concentración (pg/mL).

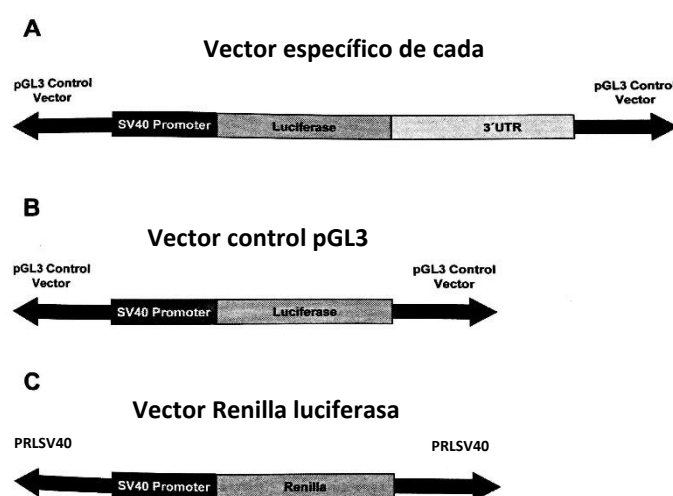
## 10 ENSAYO DE PINOCITOSIS

Para el estudio de la actividad de captación de moléculas no mediada por receptores (pinocitosis) se utiliza Dextrano-FITC de 70 kDa (SD70S, Sigma-Aldrich) en una concentración final de 1 mg/ml. Se añade al medio de cultivo durante 6 horas a 37 °C, previo a la recogida de las placas. Después de la incubación, las muestras son fijadas a 4% de paraformaldehído y los cubres se montan con *prolong antifade reagent* (Invitrogen) con DAPI. Las imágenes son obtenidas con un microscopio confocal Leica TCS SP5.

## 11 CLONAJE DE GENES Y ENSAYO DE LUCIFERASA

Para determinar si los mensajeros diana predichos y seleccionados son realmente controlados por el miRNA, la región 3'UTR de los genes MMP-13, MMP-9 y Slug se inserta después de la región que codifica para el gen de luciferasa del vector pGL3 (Promega), usando el kit de clonaje IN- Fusion PCR (Clontech-Takara).

El vector control se dirige con XbaI y cada gen se amplifica desde cDNA usando primers específicos diseñados con cierto número de pb en los extremos que solapan con el control pGL3.



**Fig 3: Representación esquemática de los vectores usados en los experimentos de reporteros de luciferasa.** (A) Esquema del vector de luciferasa específico de cada gen. (B) vector vacío (control pGL3) usado como control del experimento. (C) Vector de renilla luciferasa usado para la normalización.

Estos vectores son transfectados en las células una vez que están sembradas en placas de 24 pocillos y al 80% de confluencia.

Se usa 490 ng de plásmido de luciferasa (pGL3 o vector específico) por pocillo y 10 ng de plásmido de renilla luciferasa en todos los pocillos.

Al mismo tiempo, se transfectan Pre- miR- *Scrambled* y Pre- miR-127 a una concentración final de 0,1, 1 y 10 nM en un volumen de 50  $\mu$ L del medio de transfección que se completa hasta 100  $\mu$ L pasados 10 minutos de la incubación de 1  $\mu$ L de Lipofectamina en 49  $\mu$ L de Opti-MEM.

A los 20 minutos de haber echado la Lipofectamina sobre las diferentes condiciones de transfección, se añade el volumen total de 100  $\mu$ L sobre 500  $\mu$ L de Opti-MEM con los que se sustituye el medio de cultivo completo de cada pocillo.

Se mide la actividad luciferasa después de 48 horas utilizando el kit *Dual- Luciferase Reporter System* (Promega) y usando un luminómetro Berthold Sirius con su software asociado.

La actividad luciferasa se normaliza usando los valores de renilla para cada muestra.

## 12 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL EN CÉLULAS Y TEJIDOS

Para los estudios de expresión génica en células HK2, NRK-49F o en tejido renal se extrae el RNA total por el método de isotiocinato de guanidinio, fenol y cloroformo, utilizando una solución comercial (Tripure, Roche).

En primer lugar se homogenizan las muestras con 500 µL- 1 mL de *TRI Reagent solution* según la cantidad de material celular o de tejido del que dispongamos y se recolectan las muestras en Eppendorfs, donde fueron incubadas durante 5 min a temperatura ambiente.

Posteriormente se añaden 200 µL de cloroformo por 1 mL de *TRI Reagent solution*, se mezcla bien con ayuda de vórtex y se incuba a temperatura ambiente durante 5-15 minutos. Tras este tiempo son centrifugadas a 12000 g durante 10-15 minutos a 4°C y las fases acuosas son transferidas a un tubo nuevo.

Para la precipitación del RNA y el lavado de las muestras, se añade 1mL de isopropanol por 1 mL de *TRI Reagent solution*, se vortexea durante 5-10 segundos y se incuban a -80 °C toda la noche. Al día siguiente una vez que la muestra se haya descongelado, se centrifuga a 12000 g durante 8 min a 4- 25 °C, y se desecha el sobrenadante. Se añaden 500 µL de 75% etanol y se centrifugan a 75000 g durante 5 min, se retira el etanol para proceder a otro lavado de la misma manera. Se deja el pellet de RNA al aire durante aproximadamente 1 hora con el fin de que se evapore el resto de etanol y se resuspende en 50-100 µL de agua libre de RNasas según el tamaño de dicho pellet. Para la completa disolución del RNA se incuban las muestras a 55-60° C durante 10 min.

Posteriormente se determina la concentración y pureza de las muestras con un Nanodrop 2000c (Thermo-Fisher) y se almacenan en -80°C hasta su uso.

## 13 EXTRACCIÓN DE RNA DE MUESTRAS DE SUERO

El RNA total es extraído con RNA Isolation Kit- Biofluids (Exiqon, cat no. 300112 and 300113) usando el protocolo estándar para extracción de RNA de muestras de suero del manual v 1.3. En el paso 2, para cada muestra, se prepara 60 µl de Lysis Solution BF conteniendo 1 µg de MS2 (*carrier*) RNA (Roche, cat. No. 10165948001) y 1 µl RNA *Spike-in template mixture* (miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR, RNA Spike-in kit) (Unknown sequence; Exiqon) para la normalización de los resultados, tras la detección de los miRNAs por RT- qPCR ya que en fluidos acelulares no hay un miRNA control que no varíe su expresión y pueda utilizarse como “housekeeping”.

Finalmente, el RNA es eluido en columnas añadiendo 50 µl de agua libre de RNAsas y la calidad y cantidad de RNA fue medida en Nanodrop.

El RNA es almacenado a -80 °C hasta su uso.

## 14 PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT Q-PCR):

### 14.1 Estudio de la expresión de genes

La retrotranscripción (RT) para la obtención de cDNA se realiza con Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (04897030001, Roche Diagnostics), a partir de 500 ng - 1 µg de RNA total extraído de cada muestra, y siguiendo las indicaciones del fabricante.

Tras esto, se utiliza 1 µl del cDNA obtenido, como molde para la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real (RT q-PCR) con SYBR Green I Master mix (Roche).

El gen ribosomal 28S se utiliza como control interno (*housekeeping*) para la normalización de los datos. En la amplificación del 28S las muestras se diluyen 1/100 con H<sub>2</sub>O estéril libre de nucleasas (H<sub>2</sub>O PCR; Roche)

Se utiliza un termociclador Ligth Cyclor 480 (Roche) con el siguiente protocolo de temperaturas: 40 ciclos de 95 °C 10 segundos, 60° C 20 segundos y 72 °C 20 segundos (LightCycler 480 software 1.5, Roche).

Las medidas se realizan por triplicado y el número de copias del gen se normaliza frente a la cantidad de 28S. Tras esto se analizan los datos utilizando el método de la segunda derivada con la fórmula:  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Con el método de la CT comparativa se elimina la necesidad de curvas estándar para la cuantificación relativa, siempre y cuando se realice previamente un experimento de validación para comprobar que la eficiencia de las reacciones de PCR para el control y los genes problema son las mismas y cercanas a 2. En nuestro trabajo esta comprobación se realiza para todos los genes estudiados.

Se detallan en la siguiente tabla los *primers* utilizados en este trabajo:

Gen	Especie	Forward sequence	Reverse sequence
28S	Human/ Rat	CAGTACGAATACAGACCG	GGCAACAACACATCATCAG
<i>E-Cadherina</i>	Human	ACACCAACGATAATCCTCCGA	CATCAGCATCAGTCACCTTCAG
$\alpha$ -SMA	Human	GAGAAGAGTTACGAGTTGCC	ATGATGCTGTTGTAGGTGGT
Colágeno 1 $\alpha$	Human	CTGGAAAGAATGGAGATGATGG	CCAAACCACTGAAACCTCTG
Fibronectina	Human	GAAAGAAATCAACCTTGCTCCTG	GTCTGCTTGTCAAAGTGTCTT
TGF $\beta$	Human	GGAAACCCACAACGAAATCT	TAACTTGAGCCTCAGCAGAC
TGF $\beta$ R2	Human	AAGGAAGGGACCCATGACAG	ATGGCCAGAAGAGAAGTGCT
FGF 2	Rat	TCTTCCTGCGCATCCATC	GCTTGGAGCTGTAGTTTGACG
PDGF B	Rat	CCGCTCCTTTGATGACCTTC	CTCAGCCCCATCTTCGTCT
Interleuquina-1 $\beta$	Rat	TGTGATGAAAGACGGCACAC	CTTCTTCTTTGGGTATTGTTTGG
$\alpha$ -SMA	Rat	ACCCAGATTATGTTTGAGACC	AGAGTCCAGCACAATACCAG
Colágeno 1 $\alpha$	Rat	GTGGAAACCTGATGTATGCT	TGGTGATACATATTCTTCTGGG
Fibronectina	Rat	GCCCTTACAGTTCCAAGTTCC	GCCTACAGTAACAACCTCTTCTC
TGF $\beta$	Rat	CAACAATTCTGGCGTTACC	TATCCGTCTCCTTGGTTCAG

**Tabla 3: Secuencias de primers utilizados.** Cebadores sintetizados por TIB<sup>®</sup>Molbiol. Stock: 100  $\mu$ M. Concentración de uso: 10 $\mu$ M.

## 14.2 Estudio de la expresión de miRNAs

El cDNA para el estudio de expresión de miRNAs en las muestras se obtiene con el kit comercial miRCURY LNA<sup>™</sup> Universal RT microRNA PCR, Polyadenylation and cDNA synthesis kit II (8-64 rxns) (Exiqon), partiendo de 200 ng de RNA de cada muestra o 4  $\mu$ L volumen constante en caso de muestras de suero, y siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Este kit comercial incluye la sonda cel-miR-39-3p como control externo de RT (*spike-in*).

Como molde para la reacción de la RT-qPCR se utilizan 4  $\mu$ L del cDNA obtenido en la RT, en dilución 1/11 con H<sub>2</sub>O estéril libre de nucleasas (Exiqon). Todas las reacciones se llevan a cabo por duplicado o triplicado, utilizando SYBR Green (Exilent) y cebadores LNA específicos comercializados (Exiqon) para cada miRNA de interés. En este caso, se usa el  $\Delta$ Ct de la sonda 5S-rRNA como *housekeeping*, o el *Spike-In* añadido en la extracción en caso de ser muestras de suero, para la normalización del número de copias de cada miRNA estudiado.

Según la fórmula:

$$\Delta Ct = \text{miRNA Ct} - \text{Housekeeping/ Spike In Ct}$$

El protocolo de temperatura que se utiliza en el termociclador LightCycler 480 (Roche) fue: Activación de la enzima a 95° C 10min; 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos, y 60°C 60s (LightCycler 480 software 1.5, Roche). El análisis y representación de los resultados nuevamente se realiza mediante el método de la segunda derivada con la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Para miRNAs y genes se determina la especificidad del producto amplificado mediante el estudio de la temperatura de meelting, siendo la misma en todas las determinaciones para un mismo amplicón y específico para cada producto.

## 15 ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS

Con ayuda de un microtomo (Microm HM 325, Thermo Scientific) se realizan unos cortes de biopsias renales humanas embebidas en parafina, de 3  $\mu\text{m}$ . Posteriormente se sumergen los portas durante 2 minutos en Hematoxilina de Harris y a continuación se pasan por un baño de eosina alcohólica durante 30 segundos y se lavan con agua corriente hasta obtener la tonalidad deseada. Además de la tinción de hematoxilina/ eosina para observar la estructura tisular, el grado de fibrosis se evalúa mediante tinción con tricrómico de Masson. Una tinción especial para visualizar las fibras de colágeno tipo I, que nos permite detectar el acúmulo de matriz extracelular como integrante de fibrosis en el corte renal. Según el protocolo, tras desparafinar e hidratar las muestras, se alternan lavados de agua con incubaciones con hematoxilina, fucsina de Ponceau, ácido fosfomolibdico y verde luz. Se observan y se adquieren las imágenes en un microscopio de contraste de fase Nikon Eclipse TE2000-U.

## 16 INMUNOHISTOQUÍMICA

Para estudios de inmunohistoquímica se utilizan cortes obtenidos de la misma forma que para los estudios histopatológicos (3 $\mu\text{m}$ ). Son hidratados y sometidos a un proceso de desenmascaramiento antigénico, en una olla a presión, con tampón citrato (0,1 M). Posteriormente se hace un bloqueo de la peroxidasa endógena (Peroxidasa blocking solution) durante 15- 30 minutos, en una cámara húmeda y a temperatura ambiente. Tras el bloqueo de la peroxidasa se realizan 3 lavados de 5 minutos en PBS con Tween 20 al 0.05%. Se bloquea el tejido durante 30 minutos en PBS más 1% de BSA. Tras ello se incuban las muestras con el anticuerpo primario a una concentración 1:50 durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se realizan otros tres lavados de 5 minutos en PBS- Tween 20 al 0.05%. Se incuban las

muestras con el anticuerpo secundario (Envision) durante media hora a temperatura ambiente. Tras realizar otros tres lavados, se procede a visualizar la señal con un kit de revelado que contiene DAB en buffer sustrato. Cuando el tejido empieza a tomar coloración marrón se detiene la reacción con agua y se contrastan los núcleos, haciendo una tinción con hematoxilina. Se deshidratan las muestras pasándolas por una cadena de alcoholes y se montan los portas con los cubres, utilizando como medio de montaje DEPEX. Las imágenes se toman con el microscopio Nikon Eclipse TE2000-U con cámara Nikon Digital Sight incorporada y se procesan con el software NIS-Elements BR 3.1

## 17 HIBRIDACIÓN IN SITU DE miRNAs

Las secciones de tejido de 3-4  $\mu\text{m}$  incluidas en parafina se recogen en portaobjetos *Superfrost Plus Slides* (Thermo Scientific). Se desparafinan con tres lavados de xilol de 10 min cada uno, y se rehidratan mediante un gradiente decreciente de etanol (100, 96, y 70%) en disolución con agua DEPC, 5 min. A continuación, se tratan con Proteinasa K (Qiagen) (3  $\mu\text{l}$  /ml PBS 1X) a 37°C entre 13-20min según el tejido, tras lo cual se lavan con agua DEPC 5 min a temperatura ambiente. Después se añaden 25  $\mu\text{l}$  de sonda específica para detección del miRNA a estudiar, en este caso fue Mercury LNA Detection probe hsa-miR-127-3p (Exiqon) (1  $\mu\text{l}$  sonda/ 250  $\mu\text{l}$  agua DEPC/ 250  $\mu\text{l}$  de Formamid-free microRNA ISH Buffer, Exiqon), se cubren, y se sellan los cubreobjetos con pegamento Fixogum (Marabu) para evitar evaporación durante la incubación a 37°C en cámara húmeda 24h. Pasado este tiempo, se lavan las muestras en SSC 5X a 60°C durante 5min, y se incuban con 100  $\mu\text{l}$  de Blocking Reagent Solution 1X (Roche) a temperatura ambiente, 5 min. Tras esto, se añaden 200  $\mu\text{l}$  de DIG-AP antibody (1:800) (Roche) y se incuban los cortes a temperatura ambiente, 1h. Tras dos lavados con PBS 0,1% Tween-20 de 5 min cada uno, se añaden 150  $\mu\text{l}$  de la siguiente disolución: 200  $\mu\text{l}$  de NBT-BICP Stock Solution (Roche) en 10ml de 0.1 M Tris HCl /NaCl pH 9.5, y se incuban los cortes a 37°C durante 2h en cámara húmeda. Luego, se realizan tres lavados consecutivos con 0.1% PBS-Tween 20 de 5 min cada uno, y otros dos lavados de 5 min con agua DEPC. Por último, se añaden 200  $\mu\text{l}$  de Nuclear Fast Red (Sigma Aldrich) y se incuban los cortes a temperatura ambiente durante 1h. Se lavan con agua corriente durante 1 min. Finalmente, se rehidratan las muestras en un gradiente creciente de etanol (70, 96, 100%) 1 min en cada uno, y se montan las preparaciones con *FLUKA Eukit® Quick-hardening Mounting Medium*, para su observación en el microscopio y toma de imágenes, tal y como se ha comentado en los apartados anteriores.



## 18 MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

### 18.1 Animales

Se emplean ratones macho de la cepa C57/BL6 de entre 20-25 g de peso que son obtenidos de Harlan y estabulados en condiciones estándar, con acceso *adlibitum* de comida y agua. El modelo experimental se llevo a cabo en el Servicio de Cirugía Experimental y Animalario del CBM, de acuerdo a la legislación española vigente (RD 53/2013), con aprobación de la EU Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (UE63/2010), y tras la aprobación del protocolo por el Órgano competente de la CAM.

Los animales se organizaron en tres grupos experimentales:

- Animales sometidos a OUU 5d (contralateral y obstruido).
- Animales sometidos a OUU 15d (contralateral y obstruido).

#### 18.1.1 Modelo *in vivo* de obstrucción ureteral unilateral (OUU)

La obstrucción ureteral unilateral (OUU) es un modelo muy utilizado para reproducir la fibrosis renal subyacente a la ERC en humanos (Chevalier *et al.*, 2009) por reflujo constante de orina al riñón y por ello se selecciona para este trabajo. Los animales son anestesiados por inhalación de isofluorano (2.5%) (Laboratorios Abbott) antes de proceder con la obstrucción ureteral del riñón derecho de cada animal. El riñón izquierdo no sufre obstrucción y se utiliza como contralateral para los estudios histopatológicos.

La cirugía consiste en una incisión de 1 cm aproximadamente en un lateral de la línea alba, un poco por encima de la mitad del abdomen y con ayuda de un par de hisopos humedecidos en suero, se saca el riñón para poder estirar el uréter con una pinza y colocar unas suturas guía calculando una división del uréter en cuatro partes, para clampar los dos cuartos de los extremos y cortar por la mitad. Tras esto, el riñón se vuelve a introducir, se cierra la incisión para mantener al animal hasta el día de sacrificio, según el tiempo establecido en el protocolo experimental. El sacrificio tras el proceso quirúrgico se realiza por sobredosis de anestesia. Al sacrificio se extraen los riñones diseccionando el pedículo renal. La mitad de los riñones se incluyen en parafina (Parafinador Myr EC350-1) para estudios de histopatología, y la otra mitad se almacenan en nitrógeno líquido para estudios de RNA.

## 18.2 Muestras de pacientes de Enfermedad Renal Crónica

Todos los experimentos que incluyen muestras humanas han sido revisados y aprobados por el comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Ramón y Cajal después de que los pacientes o sus representantes legales hayan sido informados y hayan firmado el consentimiento informado. Las muestras utilizadas, tanto parafinas como sueros han sido cedidas previa aprobación por el Biobanco del Hospital Ramón y Cajal.

### 18.2.1 Biopsias humanas

Para el estudio histopatológico de la biopsia renal de los pacientes, se utiliza la clasificación Banff (Solez K et al., 2008; Bhowmik DM et al., 2010). Ésta está disponible desde la década de los 90 y se han ido introduciendo modificaciones hasta establecer una amplia clasificación para los riñones donados para trasplante y para la valoración del injerto en el receptor incluyendo el grado de fibrosis. Dentro de las características evaluadas en el tejido para la clasificación de las biopsias a nivel histopatológico, tenemos en cuenta la fibrosis intersticial y atrofia tubular (FIAT) por coincidir con las características de ERC objeto de estudio de este trabajo, según la cual los pacientes se estratifican en tres grados en función de que la FIAT sea: baja, moderada o severa (Solez K, 2008; Bhowmik DM, 2010).

Las biopsias humanas utilizadas son cilindros renales de injertos que han sido transplantados y que durante el postransplante, presentan diferentes grados de fibrosis según la clasificación mencionada previamente. Se recogieron todos los datos clínicos y patológicos para correlacionarlos con los datos de las PCRs, hibridación *In Situ* e inmunohistoquímicas de nuestro trabajo.

### 18.2.2 Muestras de suero de pacientes con ERC establecida

Las muestras de sangre se extraen en tubos de 8 mL Vacuette Z sep Clot Activator. El suero se obtiene por centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos. Se almacena en alícuotas de 250 µl a -80 °C según la guía estándar de calidad del Biobanco del Hospital Ramón y Cajal- IRYCIS (ISO 9001).

Todas las muestras son anonimizadas y se identifican por un código asociado al documento que contiene toda la información, así como la fecha y la hora de congelación y otros datos relevantes para el estudio como edad, sexo, diagnóstico de la enfermedad renal de base, Crs, urea, Fg-e, CO2 total, proteinuria, descripción del sedimento, historia de hipertensión arterial, diabetes

*mellitus* y otros datos epidemiológicos. Las muestras son cedidas tras ser solicitadas, según los procedimientos establecidos por Biobanco.

## 19 ESTUDIO DE DIANAS PREDICHAS Y VALIDADAS DE miRNAs

Para conocer la implicación funcional de los miRNAs estudiados en este trabajo se hace un estudio de sus dianas predichas y validadas en las siguientes bases de datos Targetscan Human 7.1 (<http://www.targetscan.org/>) y miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>). La lista de los genes diana así como su implicación funcional son obtenidas usando Bioinformatic Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/tools.jsp>).

## 20 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se muestran como la media  $\pm$  desviación estándar, ya que las aproximaciones experimentales se han llevado a cabo de forma independiente, al menos tres veces. Se realiza el test Shapiro-Wilk para confirmar o rechazar la distribución normal de los datos y el test de Levene para homogeneidad de la varianza. En caso de distribución normal se utilizan pruebas paramétricas: T- Student y ANOVA y para datos con distribución no normal se utilizan pruebas no paramétricas: test de Kruskal-Wallis y el test Mann-Whitney. Se considera como significativo un valor de  $p < 0,05$ .

Análisis de curva ROC fueron llevados a cabo para evaluar la sensibilidad y especificidad de los miRNAs en los pacientes con ERC. Los análisis estadísticos se llevan a cabo con el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 24.0 y GraphPad Prism 7.

## Resultados

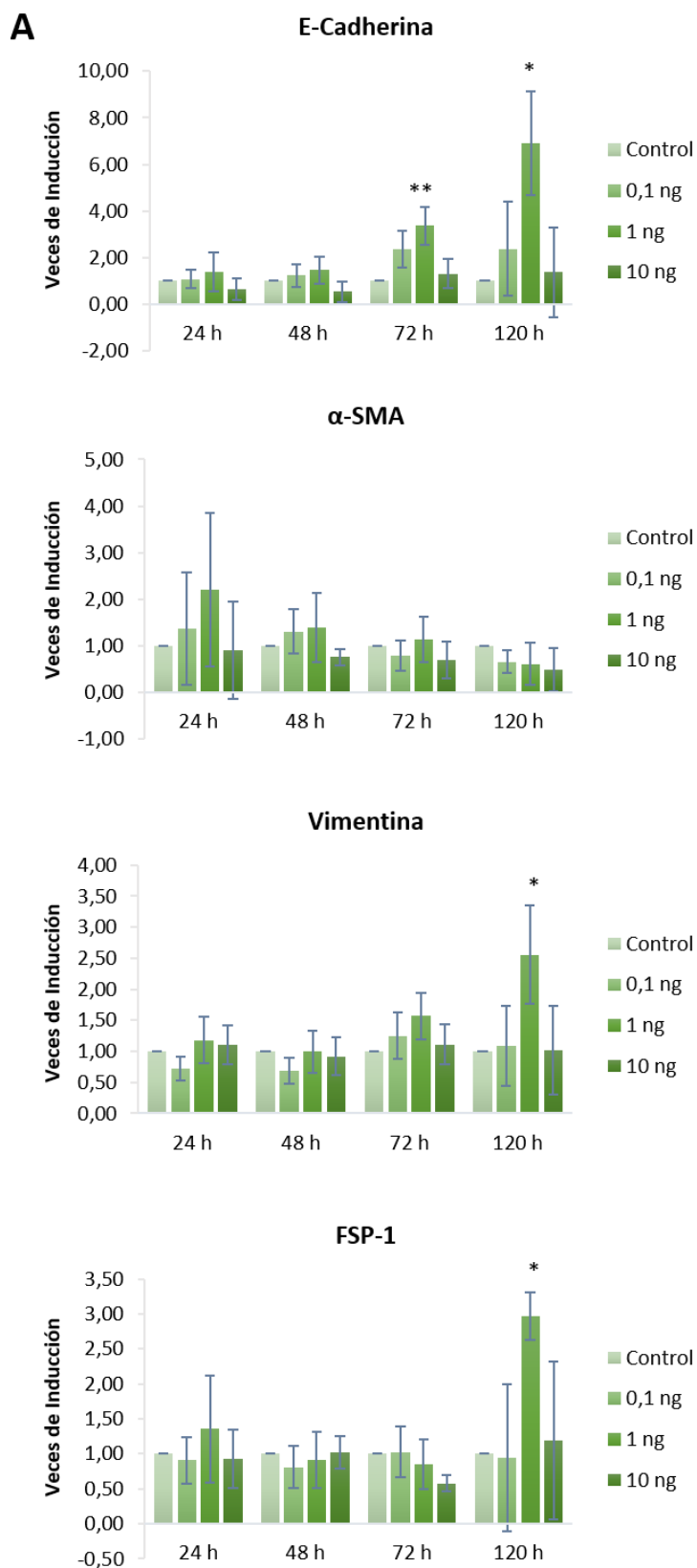
### TGF- $\beta$ induce TEM en células proximales tubulares y modula la expresión de miRNAs

Tal y como se ha descrito TGF- $\beta$  es un estímulo profibrótico clásico. Por ello ponemos a punto un modelo experimental in vitro de estimulación de células tubulares humanas HK-2 con TGF- $\beta$ , con el fin de reproducir in vitro la inducción de TEM como inicio de la fibrosis renal.

Para determinar la aparición de TEM en las células tubulares proximales inducida por el tratamiento de TGF- $\beta$ , se determina la expresión de genes característicos del fenotipo epitelial como la E-Cadherina y otros de fenotipo mesenquimal como  $\alpha$ -SMA, Vimentina y FSP-1.

Seleccionamos las condiciones de tratamiento detalladas en la fig 4: 0,1 ng, 1 ng y 10 ng y como control, un cultivo de HK-2 vehículo (solución de dilución de TGF- $\beta$ ), que consideramos Hk-2 “sin tratamiento”.

La E-cadherina mantiene sus niveles en presencia de TGF- $\beta$  a bajas concentraciones y disminuye con la concentración de 10 ng del tratamiento en tiempos cortos.  $\alpha$ -SMA parece seguir el mismo patrón que el gen anterior, E-Cadherina e incluso disminuye a tiempos largos, en contra de lo que cabría esperar en un proceso de transición total del epitelio a mesénquima. El gen Vimentina se induce en la mayoría de los tiempos para las concentraciones de 1 y 10 ng. Su expresión aumenta a tiempos largos en el caso de la menor concentración de TGF- $\beta$ . Por último, FSP-1 se induce a tiempos largos como en el caso de la Vimentina.



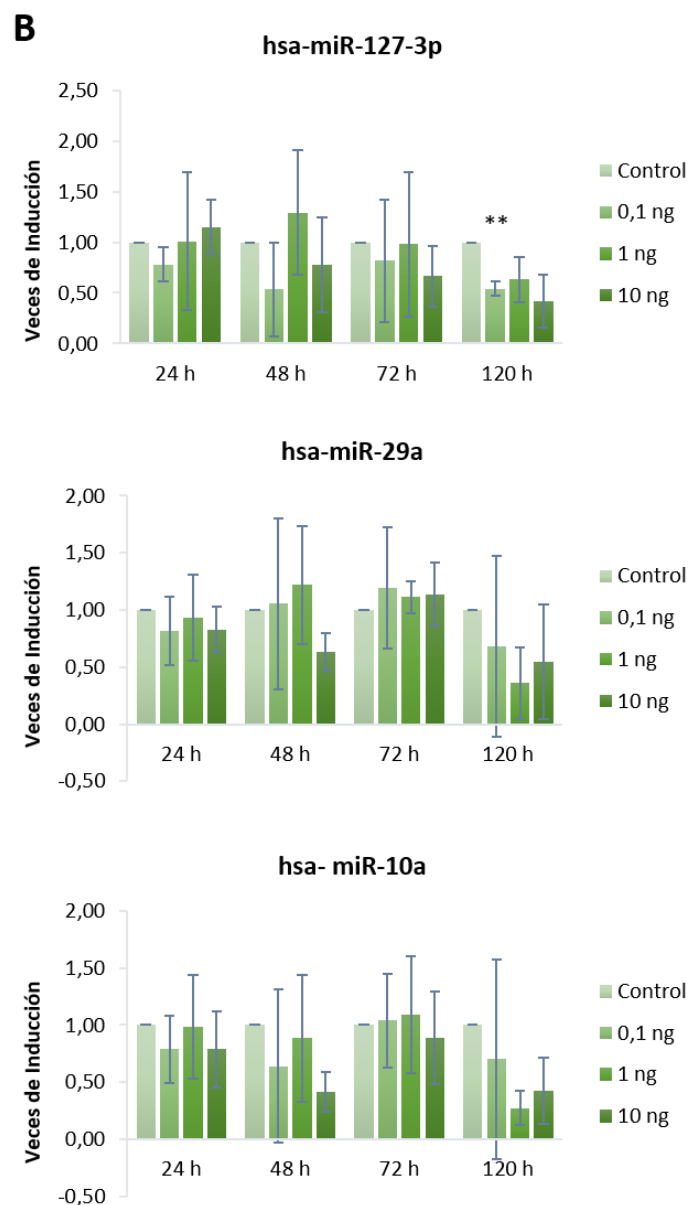
**Fig 4: Expresión de genes asociados a TEM en modelos de TGF- $\beta$  0.1, 1 y 10 ng.** La expresión de los genes se analiza mediante RT-qPCR y se representa en veces de inducción de cada concentración de tratamiento respecto a un cultivo control, sin tratamiento (vehículo). Se considera estadísticamente significativo p-valor < 0,05 (\*) o <0,01 (\*\*).

Así mismo, determinamos la expresión de miR-127, por ser objeto de estudio de nuestro trabajo, en estas mismas células epiteliales tubulares proximales tratadas con TGF- $\beta$ , mediante RT-qPCR, además de la de otros miRNAs descritos en relación con TGF- $\beta$ , como son el miR-29b y el miR-10a.

Nuestros resultados indican que el patrón de expresión es diferente para cada uno. Es importante mencionar que a tiempo más largo, 120 horas, se observa una reducción de la expresión de todos los miRNAs muy probablemente ligada a la interferencia de TGF- $\beta$  con la biogénesis de miRNAs a tiempos largos de tratamiento.

Centrándonos en el efecto que pueda tener TGF- $\beta$  sobre la expresión de miR-127, observamos que su expresión no es concentración ni tiempo dependiente en estas condiciones experimentales.

Estos resultados indican que el tratamiento con TGF- $\beta$  en estas condiciones, no induce una clara y reproducible TEM, y por ello revisamos y modificamos el modelo in vitro con TGF- $\beta$ .



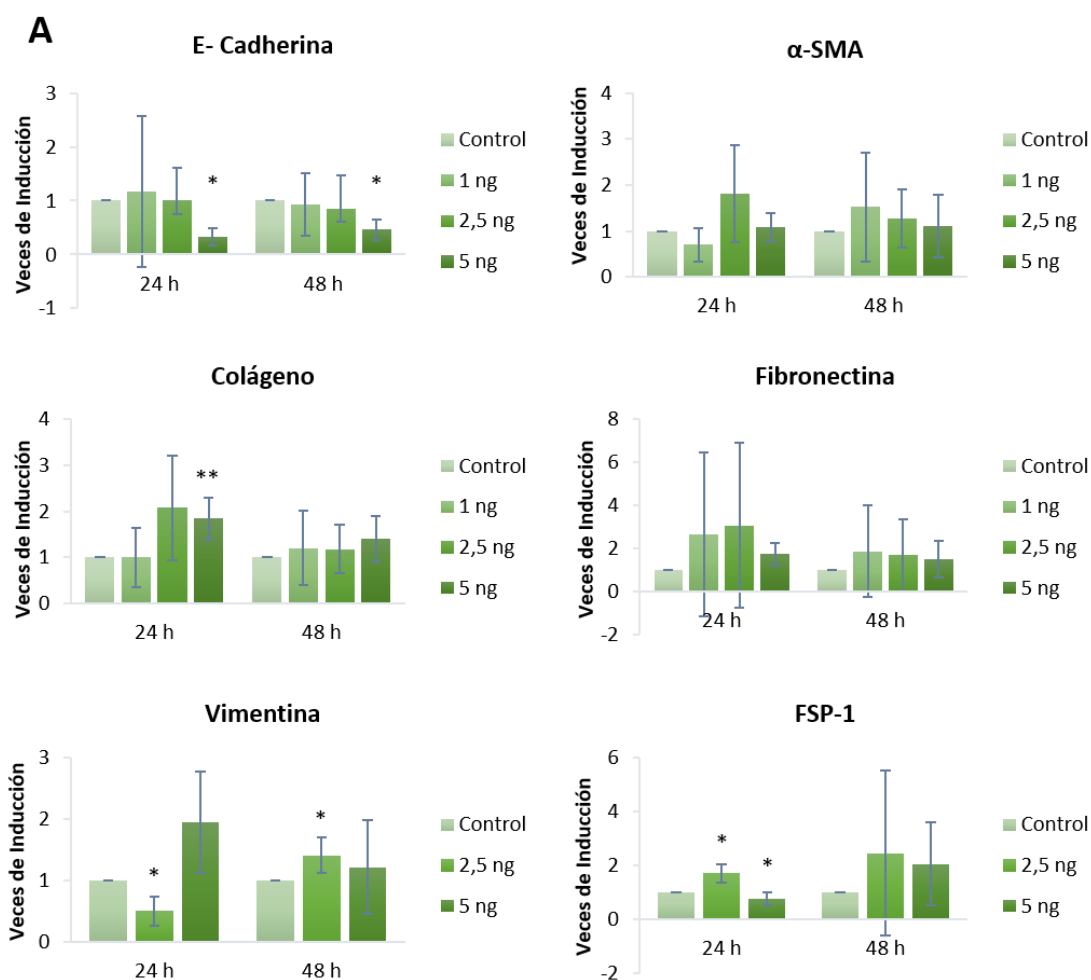
**Fig 5: Expresión de microRNAs de la combinación identificada en nuestro modelo de tratamiento con TGF- $\beta$ .** Estudiamos la expresión de miR-127, miR-29a y miR-10a en HK-2, mediante RT-qPCR. Los resultados se representan en veces de inducción de cada condición de tratamiento con respecto a su control no tratado (vehículo). Se considera estadísticamente significativo p-valor < 0,05 (\*) o <0,01 (\*\*).

Seleccionamos otras condiciones de tratamiento con TGF- $\beta$ , incluyendo la privación de suero, tiempos de tratamiento y concentraciones de TGF- $\beta$  diferentes. Además, incluimos en el estudio otros genes relacionados con el depósito de la matriz extracelular como fibronectina y colágeno.

Tal y como se observa en la figura 6, la concentración de 5 ng de TGF- $\beta$  reduce la expresión de E- Cadherina e induce  $\alpha$ -SMA, Vimentina, Colágeno y Fibronectina a 24 horas en relación a células no tratadas, así como FSP-1 a 48 horas.



Por tanto, este esquema de tratamiento y concentración de TGF- $\beta$ , parece conferir a las células HK-2 ciertas características mesenquimales en detrimento de las epiteliales atendiendo a la expresión génica, tal y como se pretendía.

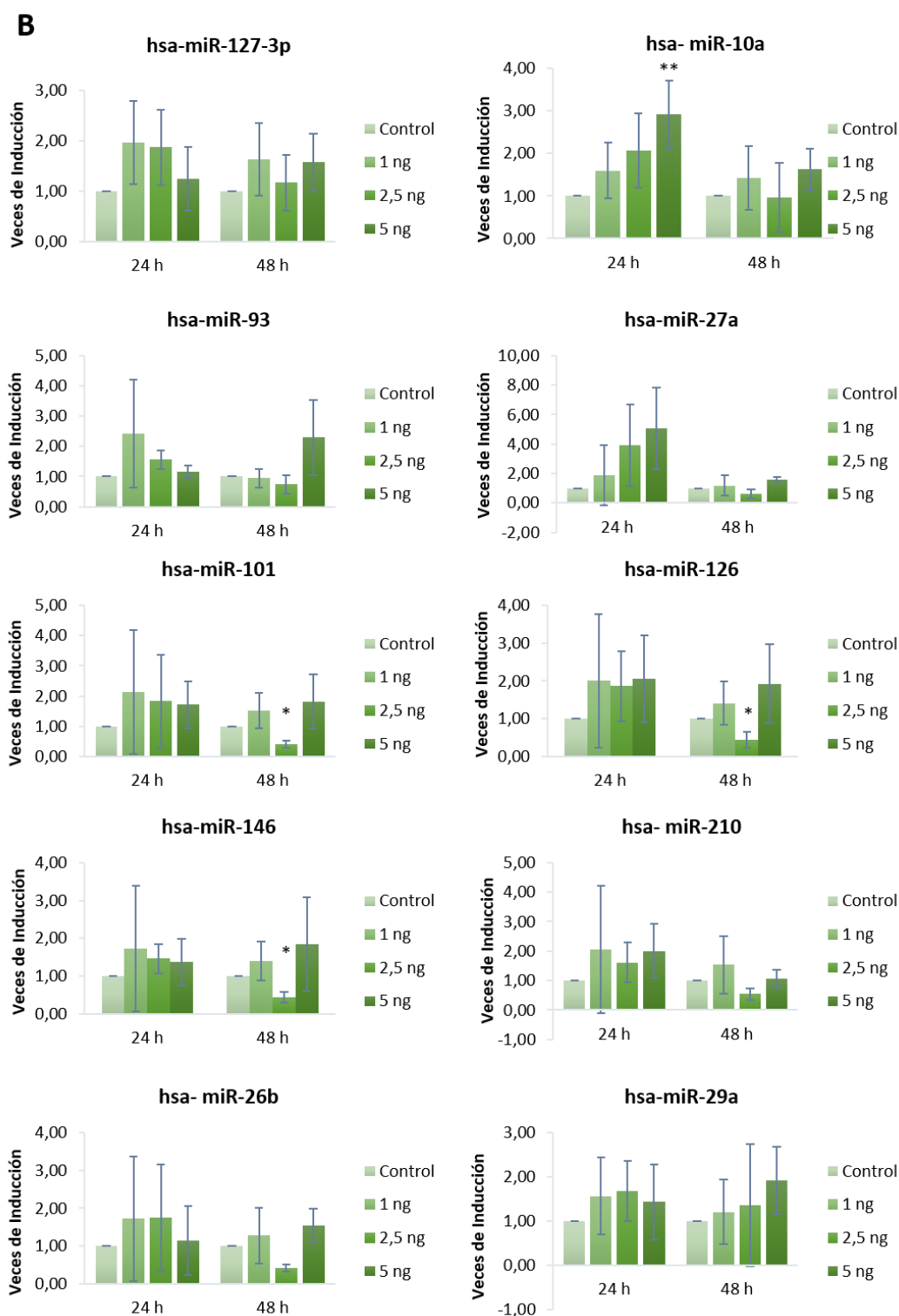


**Fig 6: Expresión de genes asociados a TEM y remodelado de la matriz extracelular en modelos de TGF- $\beta$  1, 2.5 y 5 ng.** La expresión de los genes se analiza mediante RT-qPCR y se representa en veces de inducción de cada concentración de tratamiento respecto a un cultivo control, sin tratamiento. Se considera estadísticamente significativo p-valor < 0,05 (\*) o < 0,01 (\*\*).

En estas condiciones de inducción de TEM por TGF- $\beta$  procedimos a analizar la expresión de los miRNAs de la combinación previamente identificada en nuestro laboratorio, como combinación asociada a daño proximal tubular.

El tratamiento con 5 ng parece inducir todos los miRNAs de la combinación a tiempos cortos de 24 y 48 horas, pero se observan patrones diferentes para cada uno de ellos bajo el tratamiento con TGF- $\beta$ .

En todos ellos se observa una disminución de la expresión a 48 horas del tratamiento menos en caso del miR- 29a que mantiene niveles. Y en el caso de miR- 127- 3p, objeto de estudio de esta tesis, aumenta su expresión en tratamiento con TGF- $\beta$ .



**Fig 7: Expresión de microRNAs de la combinación identificada en pacientes de FRA.** Estudiamos en las células epiteliales proximales tubulares, HK-2, la expresión de los miRNAs de la combinación identificada asociada un daño proximal tubular, mediante RT-qPCR, y representado en veces de inducción respecto a

un cultivo control no tratado (vehículo). Se considera estadísticamente significativo p- valor < 0,05 (\*) o <0,01 (\*\*).

Una vez que seleccionamos la concentración de 5 ng de TGF- $\beta$  como concentración más eficaz y reproducible para inducir TEM en células HK-2, realizamos nuevas cinéticas para determinar la expresión de los genes asociados a TEM, en el contexto de fibrosis renal.

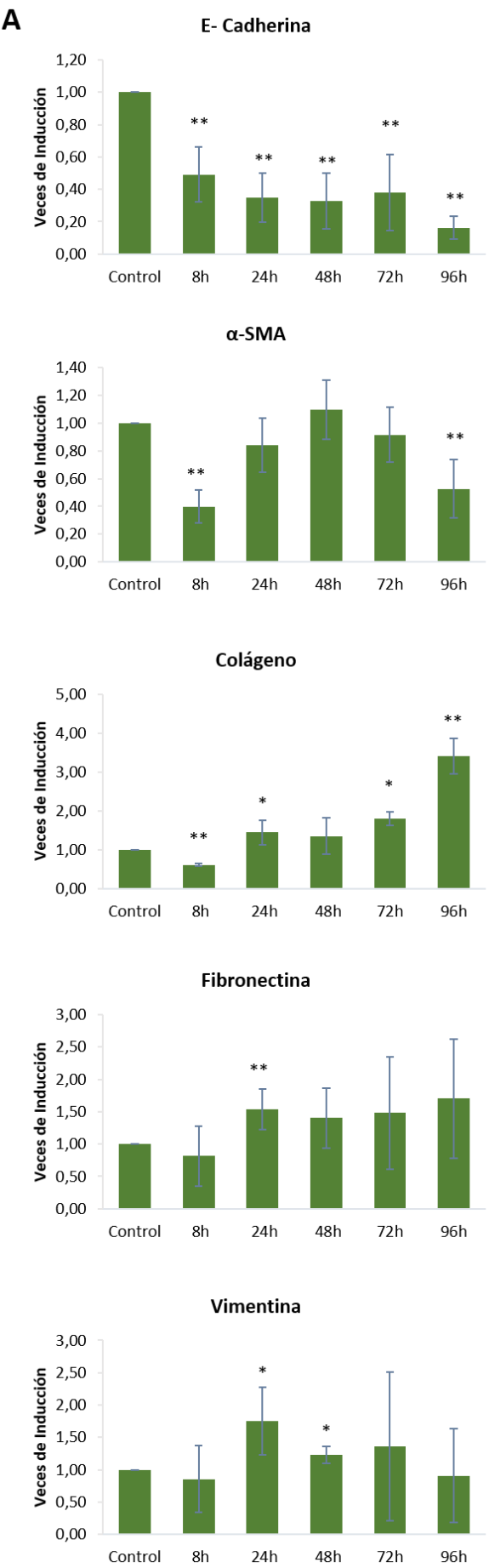
Según se observa en la figura 8, el tratamiento con TGF- $\beta$  induce pérdida de E-Cadherina en las células epiteliales desde los tiempos iniciales de tratamiento.

En correlación con la pérdida de expresión de E- Cadherina bajo tratamiento con TGF- $\beta$ , se observa aumento en la expresión de colágeno I y fibronectina, confirmando que TGF- $\beta$  a 5 ng está promoviendo un proceso de TEM.

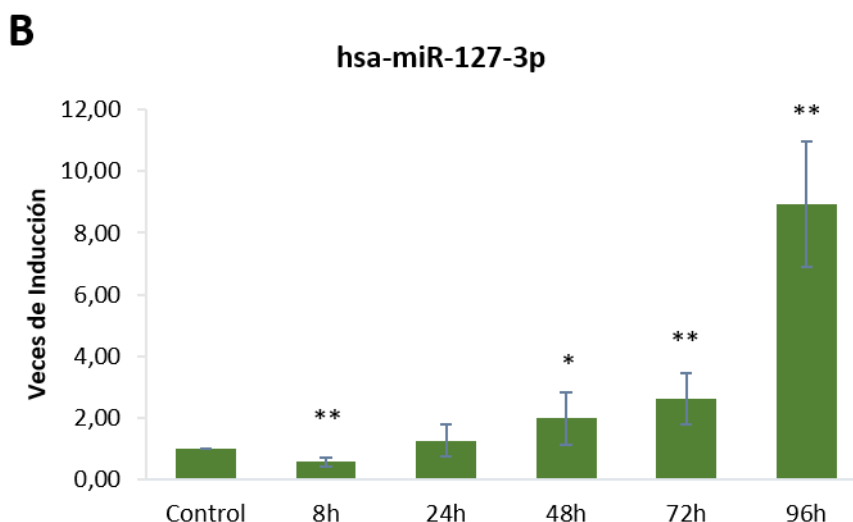
El análisis de marcadores estructurales de fibroblastos como  $\alpha$ -SMA y Vimentina van en cierta correlación también con la inducción de TEM. Se observa una tendencia de aumento de expresión, aunque los datos no son tan mantenidos en el tiempo como el de los otros genes previamente descritos.

Además, en estas condiciones de inducción de TEM por tratamiento con TGF- $\beta$ , hemos determinado la expresión de miR-127. Tal y como se observa en la figura 9, el tratamiento con TGF- $\beta$  induce la expresión de miR-127. Esta inducción parece acumulativa, ya que a mayor tiempo de tratamiento, mayor expresión del miRNA.

Así concluimos que miR- 127-3p está inducido en las células epiteliales tubulares proximales cuando estas transicionan a un fenotipo menos epitelial y más mesenquimal.



**Fig 8: Expresión de genes asociados a TEM en modelos de TGF- $\beta$  5 ng.** Se analizan las muestras mediante RT-qPCR y se representan los resultados en veces de inducción de la expresión del gen en las diferentes horas de tratamiento respecto a su control, un cultivo sin tratamiento. Se considera estadísticamente significativo p-valor < 0,05 (\*) o <0,01 (\*\*).



**Fig 9: Expresión de miR-127-3p en modelo de TGF- $\beta$  5 ng.** Se analiza la expresión de miR-127 mediante RT-qPCR y se expresan los resultados en veces de inducción de la expresión del miRNA en cada punto del tratamiento con respecto al control de expresión que es el cultivo de HK-2 sin tratamiento (vehículo). La presencia de TGF- $\beta$  estimula la expresión de miR-127. Se considera estadísticamente significativo p-valor < 0,05 (\*) o <0,01 (\*\*).

### Modulación exógena de miR-127-3p en el modelo de TEM inducido por TGF- $\beta$

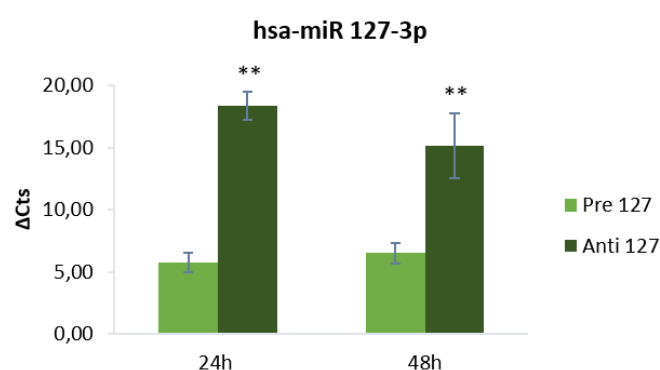
Tras establecer que tratamiento con 5 ng de TGF- $\beta$  en ausencia de suero induce TEM y miR-127, quisimos ver si la modulación de este miRNA podía tener alguna implicación en dicho proceso de transición celular.

Para ello, en primer lugar, comprobamos la eficiencia de transfección. Según los resultados representados en la gráfica A de la figura 10, se demuestra que tanto a 72 horas como a 96 horas

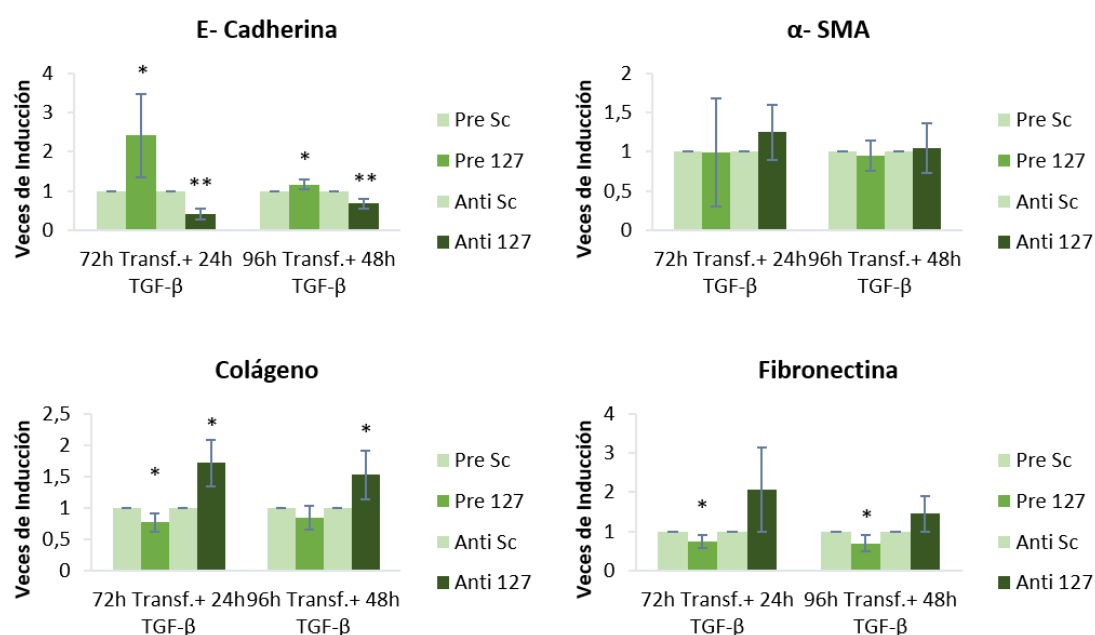
de la transfección, combinando con 24 o 48 horas de tratamiento respectivamente, el miRNA tenía más expresión en los cultivos transfectados con Pre- miR-127 que en los cultivos transfectados con Anti- miR-127, demostrando que modulamos eficazmente miR-127 en nuestro modelo.

Tras esto, estudiamos los genes relacionados con TEM y según se detalla en las gráficas del apartado B de la figura 10, observamos que la E-Cadherina disminuye su expresión en las condiciones de inhibición del micro. En correlación, los otros tres genes (Fibronectina, Colágeno I y  $\alpha$ -SMA) vinculados a la transición al fenotipo mesenquimal, aumentan su expresión cuando miR-127 se inhibe por el uso de anti-miR-127.

**A**



**B**



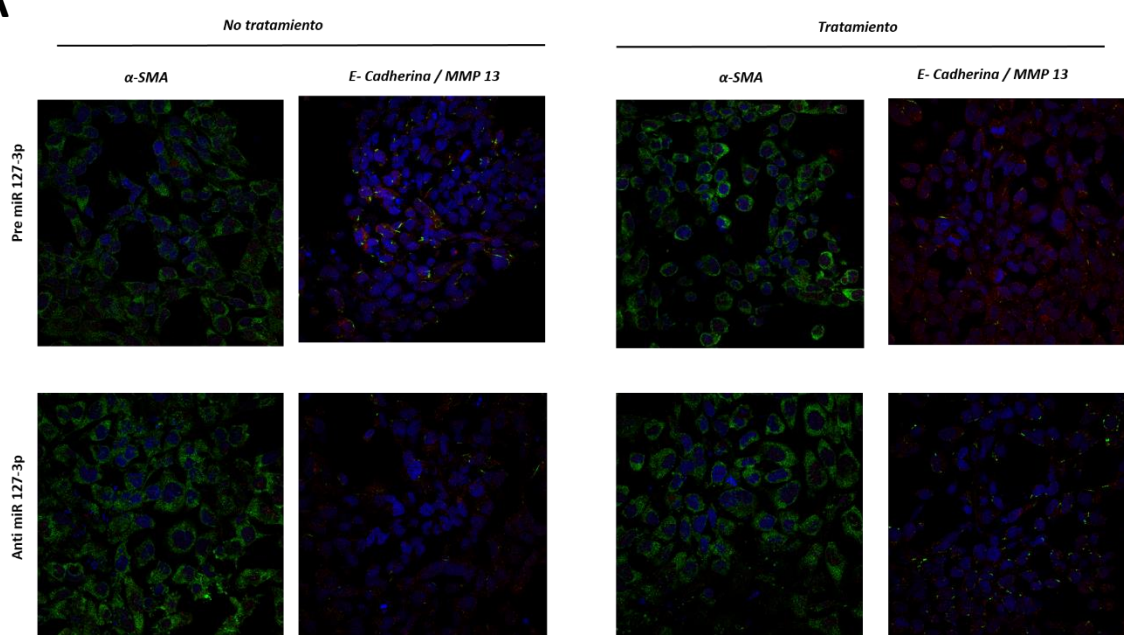
**Fig 10: Modulación de miR-127-3p en HK-2 y expresión de genes asociados a TEM bajo estimulación con TGF-β 5 ng.** Células HK-2 fueron transfectadas con Pre-miR- *Scrambled*, Pre- miR- 127-3p, Anti-miR- *Scrambled* y Anti- miR-127-3p. Cada condición *Scrambled* es considerada como control. Mediante RT-

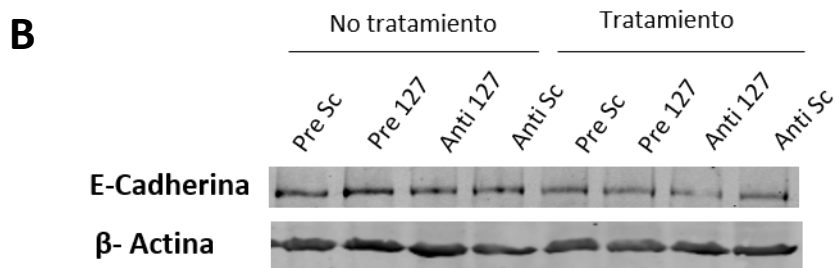
qPCRs se demuestra la eficiencia de transfección (A) representada en  $\Delta C_t$ s. Un menor valor de  $\Delta C_t$  en el caso de la transfección con Pre-miR- 127 demuestra una mayor cantidad del miRNA en las células y un valor mayor de  $\Delta C_t$ , en presencia del Anti-miR- 127, demuestra una menor expresión del miR 127 en las células. La expresión de los genes asociados a TEM (B) se representa en veces de inducción tomando como control cada condición Scrambled de la transfección para cada tiempo de la misma. Se considera estadísticamente significativo p- valor  $< 0,05$  (\*) o  $< 0,01$  (\*\*).

Por otro lado, para confirmar el efecto que tiene la modulación del miR-127 y el tratamiento con TGF- $\beta$  sobre el cultivo de células HK-2 realizamos unos western blot de una de las proteínas asociadas a TEM, E-Cadherina, cuyo gen hemos visto por RT-qPCR que se modulaba en nuestro modelo. Además, realizamos unas inmunofluorescencias de este marcador y otro de los asociados a TEM como MMP13 y  $\alpha$ -SMA.

Comparamos en este caso las células tratadas con 48 horas de tratamiento de 5 ng de TGF-  $\beta$  respecto a las no tratadas en las que el miRNA había sido sobreexpresado o inhibido para valorar el efecto de la modulación de miR- 127, durante 96 horas. Observamos que en las condiciones de inhibición del miR-127 y de manera más notable, bajo tratamiento con TGF- $\beta$ , hay una pérdida de la distribución de la E- Cadherina. Por el contrario, en las mismas condiciones en las que el miRNA está inhibido, la expresión de  $\alpha$ -SMA y MMP 13, aumenta en los cultivos tratados y no tratados.

A





**Fig 11: Expresión y localización de genes asociados a TEM.** Inmunofluorescencias (A) y Western Blot (B) para observar la expresión y localización de genes asociados a TEM y potenciales dianas de miR-127. Cultivos de HK-2 en las que se ha modulado miR-127 y que han sido tratadas con 5ng de TGF- $\beta$  o no. Se compara el efecto que tiene la sobreexpresión del miRNA con respecto a su inhibición.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, podemos confirmar que los genes seleccionados en este trabajo asociados a TEM como son:  $\alpha$ -SMA, E-Cadherina y MMP13 están modulados en presencia de un estímulo profibrotico y de manera diferencial si miR-127 está sobreexpresado o inhibido, demostrando la implicación del miRNA en el mantenimiento del fenotipo epitelial de las células tubulares proximales bajo tratamiento con TGF- $\beta$ .

### Predicción y validación de dianas de miR-127 en nuestro modelo.

Dado que miR-127 es objeto de nuestro estudio y parece estar implicado en la TEM inducida por TGF- $\beta$ , hicimos un estudio bioinformático de predicción de dianas y agrupamiento de las mismas en categorías funcionales, para determinar a través de qué efectores miR-127 está modulando este proceso de TEM.

Para ello, hemos utilizado las bases de datos TargetScan 7.1, miRBASE y DAVID y hemos seleccionados genes diana de interés en el contexto de TEM, fibrosis y en definitiva ERC.



hsa-miR-127-3p											
Diana	Función	Diana	Función	Diana	Función	Diana	Función	Diana	Función	Diana	Función
TGM2	1, 4	MAPK4	3, 4	ATXN7L3	4	MAP2K4	4, 19	SHISA7	4	SKP2	4
ING5	1, 4, 13	HMG20B	3, 4	IKBKAP	4	MEX3B	4	TTC9	4	MTSS1L	4
BAD	1,2, 4, 9, 14, 19	RASSF4	3, 4	PITX1	4, 12	YKT6	4, 5	VAMP2	4, 5, 6	SOGA3	4
GADD45G	1	SMPD3	3, 4, 17	ARMC7	4	INPP5E	4	DPH2	4	MMP13	4, 16
RIPK1	1, 4, 12	PKN2	3, 4, 9	ATP1A2	4, 19	SCARF1	4	MEGF8	4, 15	SKI	4, 12, 15
ITGA6	1, 4, 8, 9, 11, 12	TRNP1	3	C17orf96	4	SGSM2	4	SEPT7	4	XBP1	4, 10, 12, 16
SFRP1	1, 14, 18	ACO2	4	LHX1	4	TARBP2	4	BCAS3	4, 12	DAGLA	4
SDC1	2, 4, 11, 17, 18	BOLA1	4	MAGIX	4	VPS52	4, 8	EPM2A	4, 7	KCNA6	4
SEC31A	2, 4	RBPMS	4	EIF2D	4	DDX11	4	KAT5	4, 10, 12, 13	NBEA	4
AQP3	2, 6	SYN3	4	FXYD7	4	NRGN	4	PLXNA2	4	SLC29A1	4
Diana	Función	Diana	Función	Diana	Función	Diana	Función	Diana	Función	Diana	Función
USP35	4	WNT7A	12, 18	FJX1		NAT16		STEAP1B		ISCA2	
VTI1A	5	NHLH2	12	KIF3B		GPR1		BAG5		LTN1	
CREB3L1	6, 9, 12	RGMA	12, 15	PGPEP1		KLK12		CYB5D1		ACTR3B	
TPTE2	7	DLX6	14	PSMB5		RASSF3		AC011484.1		ACTR3C	
STYXL1	7	DNAJC30		XRCC3		MSC		AC090616.2		PRDM1	
MTCP1	9	FAM27D1		AL031666.2		PATE3		BFAR		ZWINT	
IL2RA	9	SLC22A9		SETD8		RASD2		MTHFSD		LGALS8	
HLA-DOA	11	SLC25A2		ADRBK1		RP11-17M16.1		ASPA		SERPINB9	
CLDN5	11	CT62		HTR1A		GJD3		CTD-3193O13.9			
RAX	12	CYB561D1		LCNL1		KLHL14		DIRAS1			
Categoría funcional:							Número	p-valor			
Regulación positiva del proceso de apoptosis							1	0,003			
Respuesta a Ca <sup>2+</sup>							2	0,007			
Ciclo celular							3	0,010			
Fosfoproteína							4	0,011			
Interacciones en transporte vesicular con SNARE							5	0,012			
Vasopresina- Regulación de reabsorción de agua							6	0,020			
Proteínas con actividad tirosina/Serina/ Treonina fosfatasa							7	0,022			
Diferenciación celular de ectodermo							8	0,024			
Ruta de señalización celular PI3K-Akt							9	0,025			
Regulación positiva de acetilación de proteínas							10	0,030			
Moléculas de adhesión celular (CAMs)							11	0,032			
Regulación positiva de la transcripción desde el promotor de RNA polimerasa II							12	0,037			
Estructura y dinamismo de cromatina							13	0,054			
Regulación positiva de proliferación celular del epitelio							14	0,056			
Ruta de señalización celular BMP							15	0,079			
Respuesta celular a estrés por fuerza de fluidos							16	0,081			
Regulación positiva de secreción de exosomas							17	0,087			
Ruta canónica de señalización Wnt							18	0,093			
Respuesta celular a estímulos mecánicos							19	0,094			

**Tabla 3: Predicción de dianas de miR- 127- 3p y agrupamiento funcional de las mismas.** Las categorías funcionales mostradas en esta tabla se extraen de las bases de datos KEGG y GO. Se ordenan en función de su p- valor.

Para el estudio de las dianas de miR-127 seleccionamos las categorías funcionales relacionadas con el contexto de TEM y fibrosis de nuestro estudio y de entre todas las que tienen mejor significancia estadística, las ordenamos en base a su p-valor también predicho. Posteriormente, determinamos como estas dianas se agrupan en categorías funcionales. En algunos casos se asocian con una sola categoría funcional y en otros, una misma molécula está asociada a varias funciones.

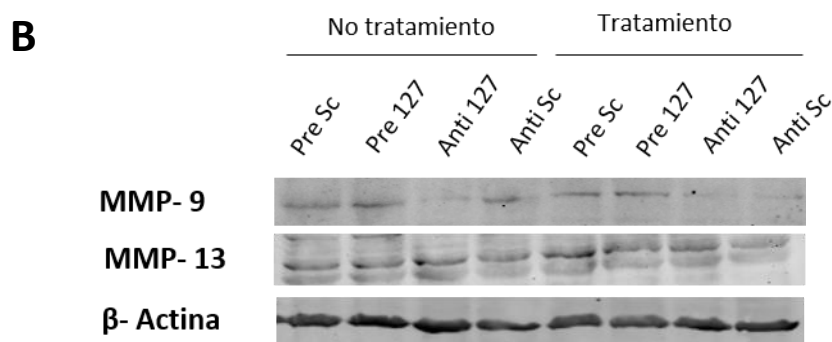
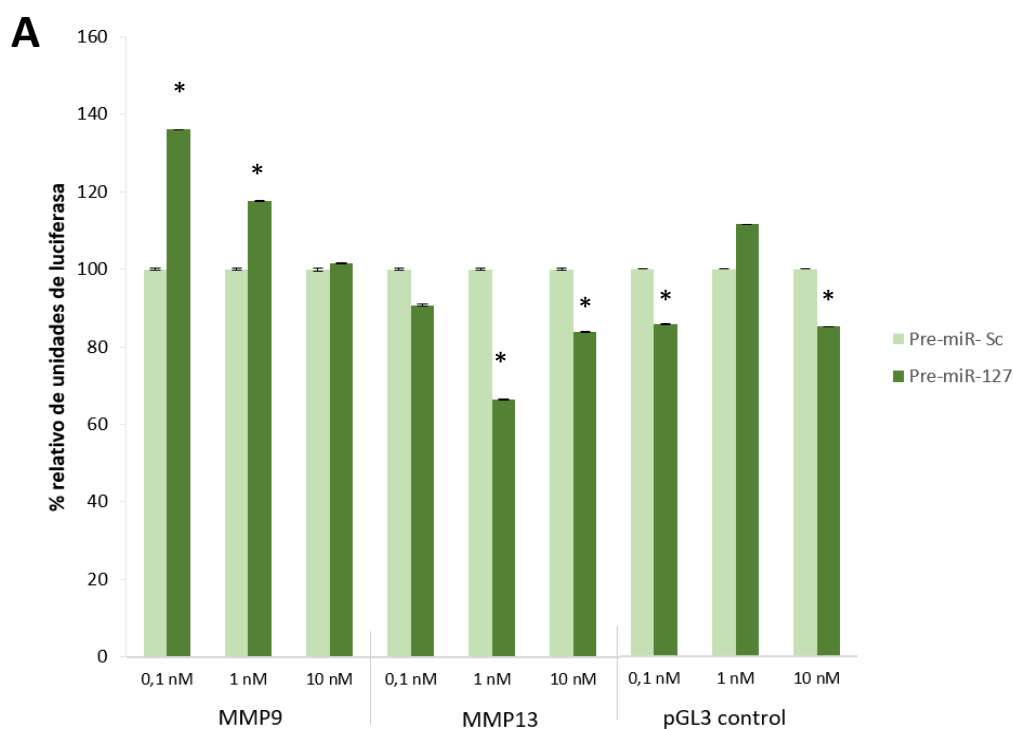
## Identificación de dianas de miR-127- 3p

Para identificar dianas por las cuales miR-127 está ejerciendo su función protectora de TEM en este modelo, clonamos las regiones 3'UTR de MMP9, MMP13, mensajero predicho como diana de miR- 127 en vectores de luciferasa y se llevaron a cabo ensayos de desestabilización del ARNm. Para esta aproximación experimental, la expresión del gen de la luciferasa se asegura mediante el promotor SV-40 y las regiones 3'UTR se clonan detrás del gen de la luciferasa, de manera que se producen altos niveles de expresión de luciferasa en condición basal, que pretenden ser reducidos por el miR-127. La transfección de Pre-miR disminuye los niveles de luciferasa en el caso de MMP13, indicando que puede ser validada como diana de miR-127-3p en nuestro sistema, tal y como confirma el estudio de western blot que también se realizó (figura 12B).

Las diferentes construcciones, tanto de los genes como un control con el vector pGL3 vacío fueron transfectadas con diferentes concentraciones de Pre-miR-127 en células HK-2. La construcción PRL-SV40-Renilla de expresión constitutiva, se usa para la normalización de los datos.

Los datos se muestran en la figura 12A como porcentaje de variación de la actividad luciferasa por Pre-127 en comparación al Pre- *scrambled* (Irrelevante =100).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, observamos que la sobreexpresión de miR-127 reduce la actividad luciferasa de la construcción que contiene MMP13, demostrando que este miRNA la regula mediante el reconocimiento de su región 3'UTR. Así la podemos considerar diana de miR-127 en nuestro sistema en contraposición a lo que sucede con la MMP9, que no se confirma como diana de miR-127 en nuestro modelo.



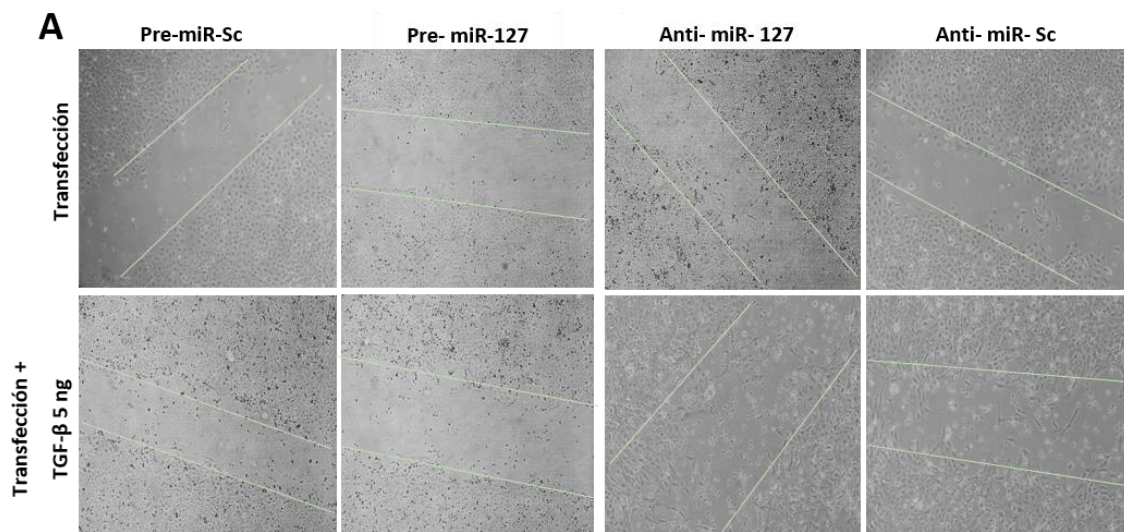
**Fig 12: MMP13 es diana de miR-127 en HK-2.** (A) Ensayos de luciferasa con vectores incluyendo la región 3'UTR de MMP9, MMP13 y el vector pGL3 vacío como control. Se representa el porcentaje de actividad luciferasa tras normalizar los valores con la expresión del vector PRL-SV40. (B) Western Blot para observar la expresión de estas moléculas, a nivel de proteína, en cultivos de HK-2 en las que se ha modulado miR-127 y que han sido tratadas con 5ng de TGF- $\beta$  o no. Se compara el efecto que tiene la sobreexpresión del miRNA con respecto a su inhibición, utilizando premiRs y anti-miRs.

## Efecto de miR-127 sobre la migración de células epiteliales tubulares

Una de las características de las células en TEM es la adquisición de capacidad de migración. Por ello, hemos realizado ensayos de herida en monocapa, en células en las que miR-127 ha sido modulado y con tratamiento con TGF-  $\beta$ .

Las imágenes de los ensayos de herida bajo modulación del miR-127 y combinando la modulación y el tratamiento con TGF-  $\beta$  en células HK-2, figura 13A, revelan que con miR-127 las células no tienen capacidad de migrar para resellar la zona de la herida mientras que con la inhibición del microRNA tienden a restablecer la monocapa del cultivo.

Este efecto se detecta en presencia y ausencia de TGF-  $\beta$ , siendo más evidente en las células sometidas a tratamiento, de manera que podemos concluir que la presencia del miR-127 evita que las células epiteliales adquieran capacidad de migración, con posible implicación en el desarrollo de fibrosis.



**Fig 13: Migración celular modulada por miR-127-3p.** Realizamos ensayos de herida en monocapa de cultivos de células HK-2 tratadas y no tratadas con TGF- $\beta$ . Los cultivos se mantienen 96 horas de sólo transfección y de transfección más 48 horas con tratamiento de 5 ng de TGF- $\beta$ . Finalmente, las imágenes son tomadas con el microscopio Nikon Eclipse TE2000-U con cámara Nikon Digital Sight incorporada y se procesan con el software NIS-Elements BR 3.1

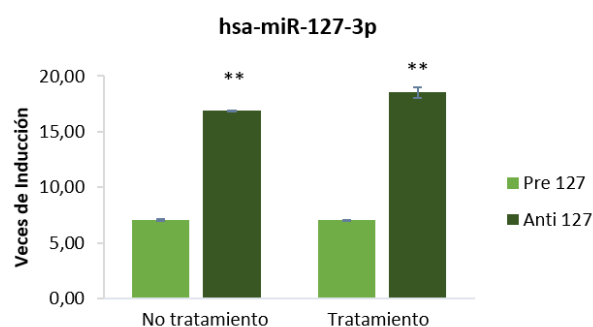
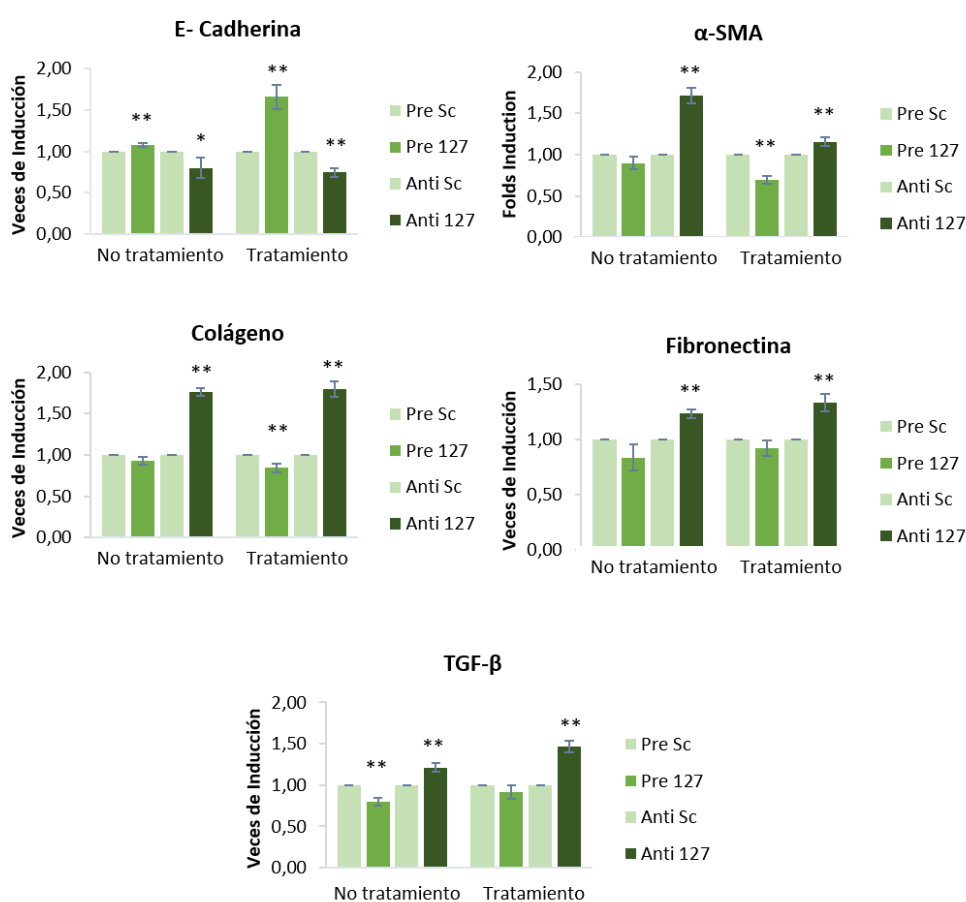
En estas mismas condiciones de reparación de herida, hemos determinado la expresión de los genes asociados a TEM estudiados por RT-qPCR.

Como se puede observar en la figura 14 la eficiencia de modulación del miR-127 valorada también mediante RT-qPCR, es adecuada e igual en ambas condiciones.

La E-Cadherina, que ha sido utilizada como marcador epitelial, aumenta en células en las que se ha sobreexpresado el miRNA y disminuye al ser inhibido, siendo algo más marcado el efecto en presencia del estímulo profibrótico.

Genes asociados a fenotipo mesenquimal como colágeno, fibronectina y  $\alpha$ -SMA tienen un patrón de expresión contrario al descrito para el gen de la E-Cadherina. En heridas provocadas en células con miR-127 sobreexpresado, tienen menos expresión y al inhibir el miRNA, aumentan su expresión. Nuestros resultados indican que el cultivo adquiere características de un epitelio transicionado, tanto en el caso en los que el cultivo está sometido a 96 horas de transfección con los moduladores respectivos para miR-127 y controles, como en los que además se les añade tratamiento de 5 ng de TGF- $\beta$  durante 48 horas.

Por otro lado, en este modelo de herida, hemos determinado la expresión del propio TGF- $\beta$ . Nuestros resultados indican que las células en las que se ha inhibido el miRNA expresan más cantidad de este factor de crecimiento, tanto en los cultivos en los que se ha suplementado con la molécula exógena como en los que se ha modulado el miR-127. Estos resultados sugieren que la inhibición del miRNA promueve migración, TEM y entre otros mecanismos, porque se induce TGF- $\beta$  en ausencia de miR-127.

**A****B**

**Fig 14: Expresión de genes de TEM en ensayos de herida en monocapa.** Observamos que la eficiencia de transfección (A) es prácticamente la misma para las células tratadas y las no tratadas. Los datos se expresan en  $\Delta$ Cts. Un valor menor indica más expresión del miRNA, como se observa en las transfecciones con Pre-miR-127 y por el contrario, un mayor valor indica menos expresión, como sucede con Anti-miR-127. Por otro lado, estudiamos la expresión de los genes seleccionados para la caracterización del modelo de fibrosis de este trabajo (B) mediante RT-qPCR. Los datos se representan en veces de inducción de la

modulación específica con Anti-miR-127 o Pre-miR- 127 respecto a su *scrambled* (control). Se considera estadísticamente significativo p- valor < 0,05 (\*) o <0,01 (\*\*)

## Expresión y actividad metaloproteinasa asociada a la modulación de miR-127

Diferentes estudios relacionan las MMPs con los miRNAs e incluso hemos demostrado que la MMP13 es diana de miR-127 en nuestro modelo. Por ello las estudiamos en sobrenadantes celulares mediante zimografía para determinar su actividad y *Western Blot*.

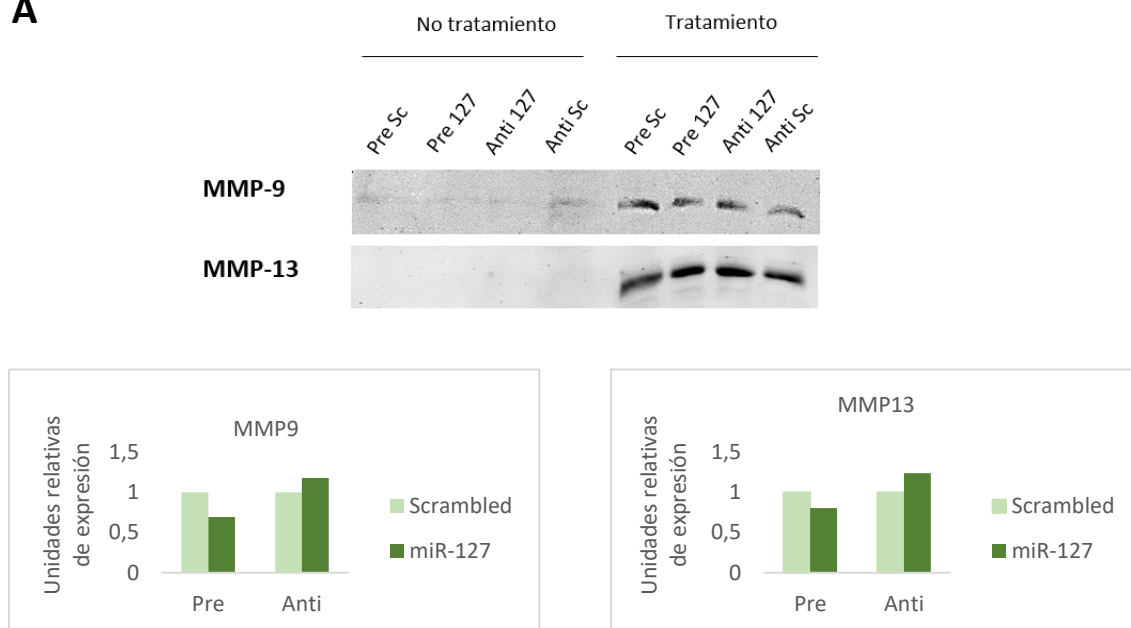
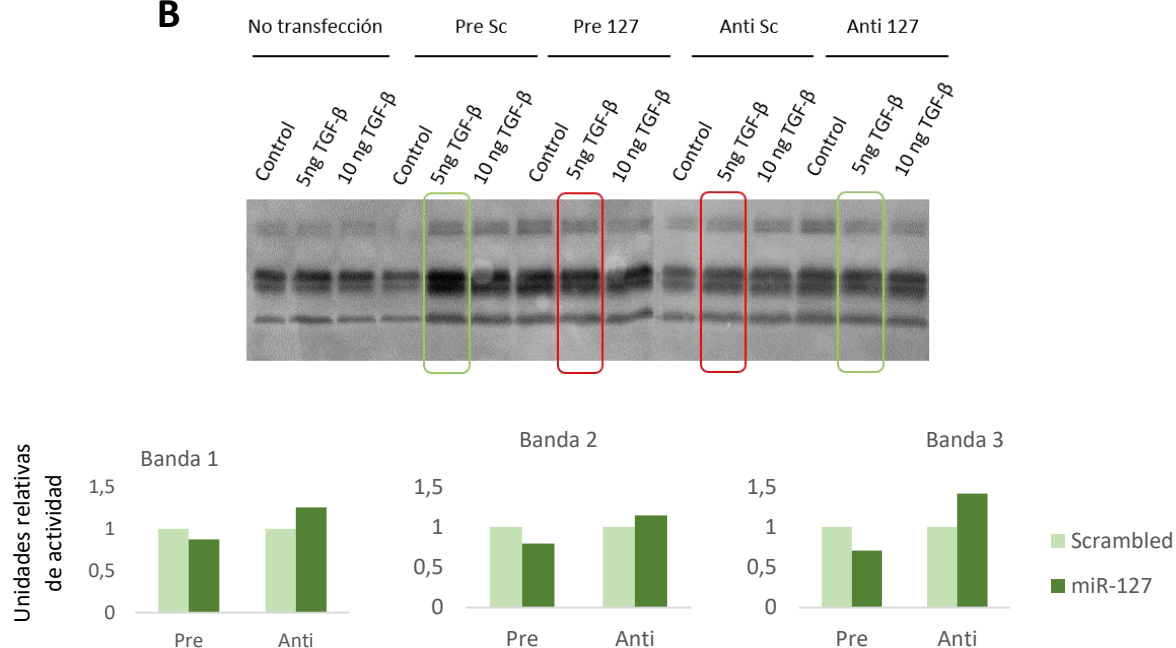
Estudiamos MMPs en células HK-2 transfectadas durante 96 horas con las diferentes condiciones y sometidas y no a tratamiento con 5 ng de TGF- $\beta$  durante 48 horas.

Nuestros datos, figura 15A, indican que la transfección de miR-127 no es suficiente para que haya una secreción de MMP9 y 13 por parte de la célula al medio, detectable mediante el anticuerpo específico. Sin embargo en tratamiento con TGF- $\beta$ , sí que se detecta actividad de las MMPs.

La sobreexpresión de miR-127 disminuye ligeramente la expresión de las dos MMPs estudiadas, con respecto a su control. Y por el contrario, la inhibición con el Anti- miR-127 aumenta la expresión de MMPs.

Además de la expresión valoramos la actividad de las MMPs presentes en los sobrenadantes con zimogramas, figura 15B. Observamos que tanto el tratamiento con TGF-  $\beta$  como la transfección, afecta la actividad de las MMPs. Sin tratamiento hay menos actividad y bajo el tratamiento con TGF-  $\beta$  observamos que la modulación con Pre- miR -127 disminuye la actividad metaloproteinasa con respecto a la de su control, Pre- miR- *Scrambled* y que la inhibición del miRNA con el Anti- miR- 127 aumenta la actividad con respecto a su *Scrambled*.

Estos datos indican que el tratamiento con TGF- $\beta$  promueve tanto la expresión de las MMPs como su actividad, y la modulación de miR-127 podría regular dichas metaloproteinasas. Esto correlaciona con los resultados obtenidos en el estudio de las MMP 9 y 13 como posibles dianas de miR-127-3p, de manera que hay menos expresión y actividad de MMP13 como diana validada del miRNA en nuestro modelo de estudio y a su vez la actividad de MMP 9, por la relación que existe entre estas dos actividades MMPs (Sakamaki Y et al., 2010).

**A****B**

**Fig 15: Expresión y actividad de metaloproteinasas.** Mediante Western Blot (A) y zimografía (B) estudiamos la expresión en células y la actividad de las metaloproteinasas en el sobrenadante de las células epiteliales tubulares proximales, HK-2, bajo tratamiento o no con 5 ng de TGF-β. Según se observa, las dos metaloproteinasas seleccionadas para este contexto, MMP9 y MMP13, se detectan en caso de que el cultivo haya sido tratado con TGF-β.



## miR-127-3p regula también la TEM en hipoxia/ reoxigenación.

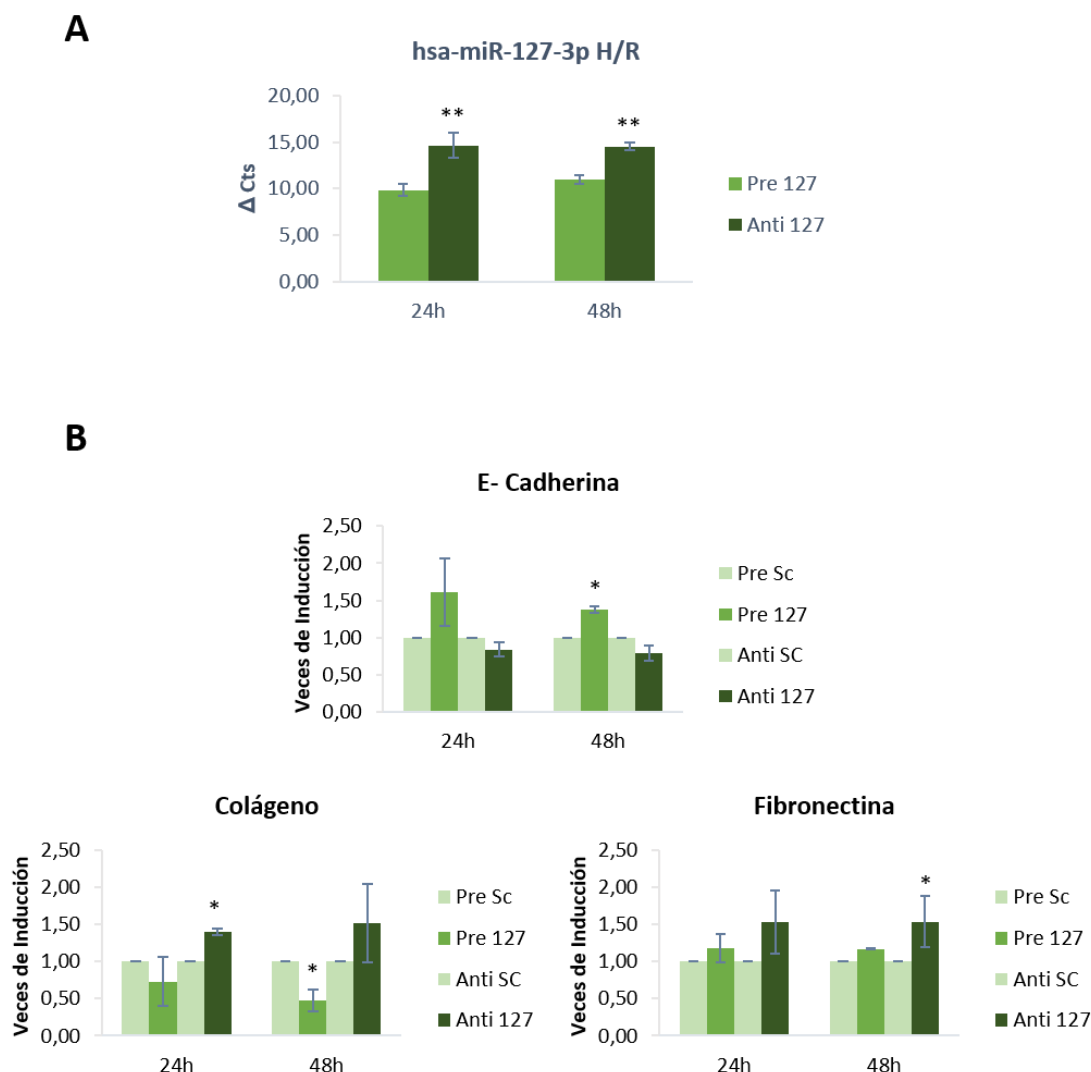
Además de utilizar el tratamiento de TGF- $\beta$  ampliamente descrito como estímulo profibrótico, estudiamos el modelo de hipoxia/ reoxigenación In Vitro, utilizando el modelo establecido en nuestro laboratorio que implica cambio en oxígeno y nutrientes, ya que también el estímulo isquémico induce TEM. Además, en este modelo también modulamos el miR-127.

Como se puede observar con la representación en  $\Delta$ Cts en la figura 16 A, el microRNA está sobreexpresado en los cultivos transfectados con Pre- miR y tiene una menor expresión en los que el Anti- miR se ha introducido en las células, indicando que la modulación es eficiente.

Se estudió también mediante RT-qPCR la expresión de los genes cuya modulación se ha asociado a TEM y se representa en el apartado B, según veces de inducción de cada condición de transfección específica con respecto a su control (*Scrambled*).

Observamos que en las células en las que se sobreexpresa el miR-127 tienen más expresión de E-Cadherina que el resto de condiciones igualmente sometidas a hipoxia, en contraposición al colágeno y la fibronectina que aumentan su expresión con la inhibición del miRNA.

Estos resultados indican que la sobreexpresión de miR-127 bajo estímulo de hipoxia/ reoxigenación mantiene el fenotipo epitelial y la inhibición de miR-127 conduce a fenotipo transicionado también bajo este estímulo, de forma análoga a lo descrito para TGF- $\beta$ .



**Fig 16: miR-127-3p también regula la TEM inducida por H/R.** Estudiamos el efecto de la modulación de miR-127-3p en otro estímulo profibrótico como es la “isquemia celular”, mediante privación de oxígeno y nutrientes en el medio celular. Se analizan los genes asociados a TEM (E-cadherina, colágeno y fibronectina) mediante RT-qPCR. La eficiencia de transfección expresada como en experimentos anteriores en  $\Delta Cts$  (A), muestra que la modulación del miRNA ha sido eficiente. Se considera estadísticamente significativo p-valor  $< 0,05$  (\*) o  $< 0,01$  (\*\*).

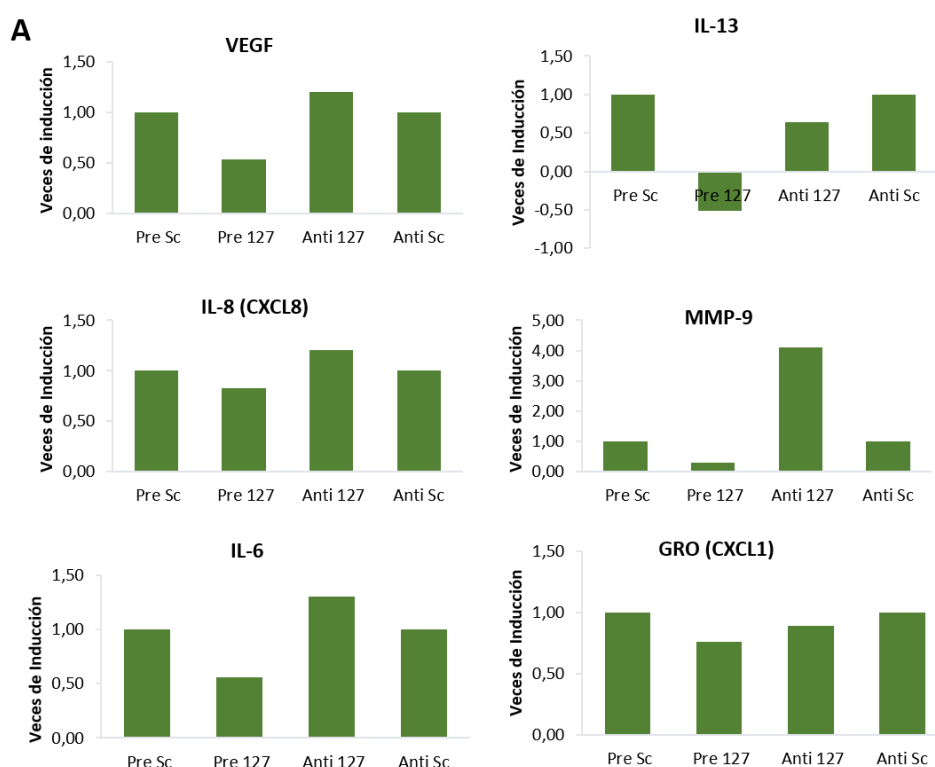
## Papel de miR-127 en el microambiente fibrótico: secreción de citoquinas y miRNAs

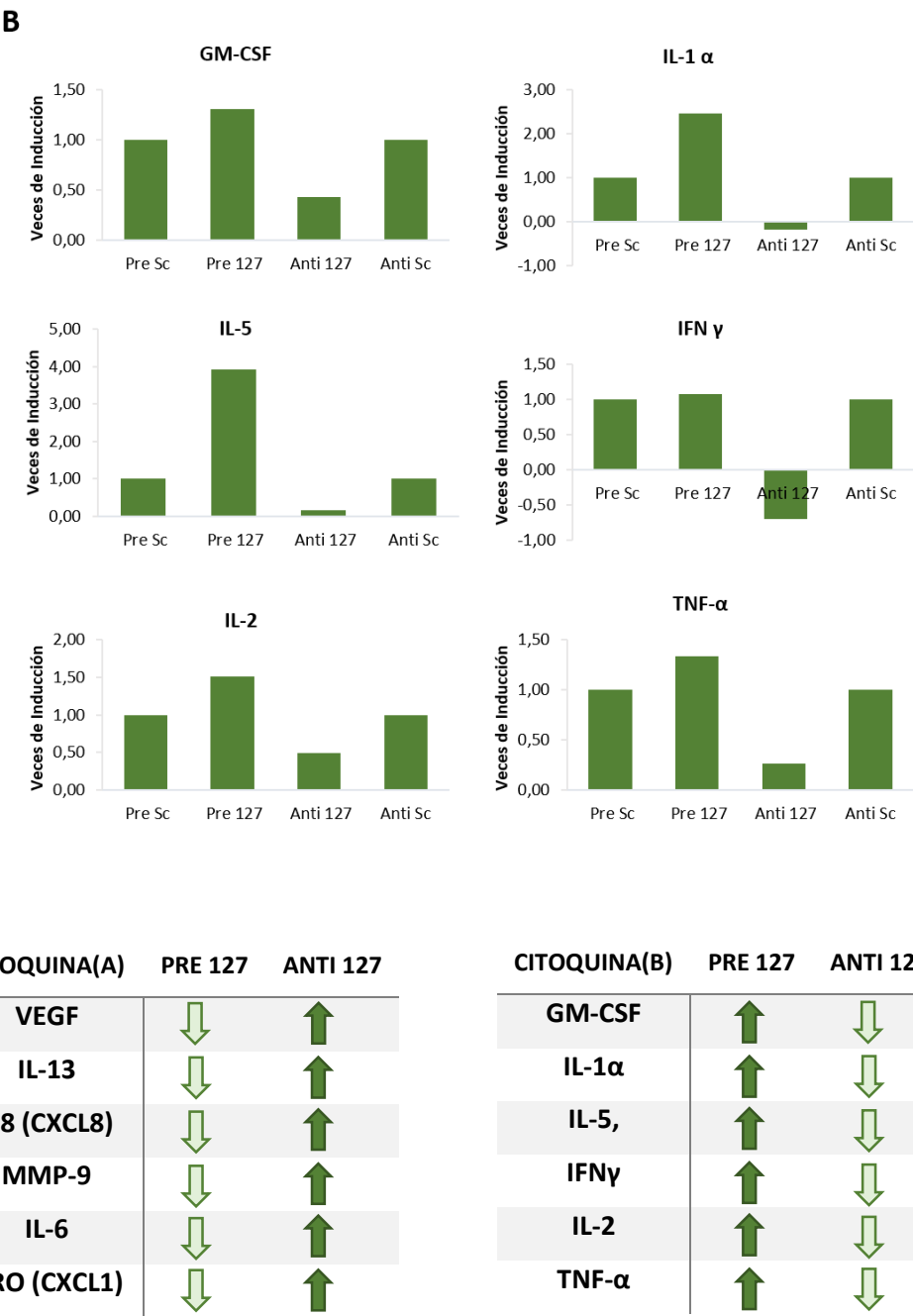
Con el fin de estudiar cómo influye la modulación del miR-127 en las células epiteliales tubulares proximales en el contexto fibrótico, estudiamos y caracterizamos los sobrenadantes de los cultivos de células HK-2 en las diferentes condiciones de transfección.

Realizamos en primer lugar un multi Array de diferentes citoquinas pro- y anti- inflamatorias tal como se muestra en la figura 17. Se observan patrones de expresión distintos en función de la modulación de miR-127.

Los resultados indican que la sobreexpresión de miR-127 (A) conduce a la disminución de citoquinas como: VEGF, IL-13, IL8 (CXCL8), MMP-9, IL-6 Y GRO (CXCL1) y al aumento de otras como: GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-5, IFN $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\alpha$ . Mientras que la inhibición de miR-127 conduce a la sobreexpresión de: VEGF, IL-13, IL8 (CXCL8), MMP-9, IL-6 Y GRO (CXCL1) y a la disminución de citoquinas como: GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-5, IFN $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\alpha$  (B).

No está detallada la desviación estándar puesto que se realizó un único experimento de aproximación. Algunas de las citoquinas disponibles en el Array no resultaron valorables mediante este método.



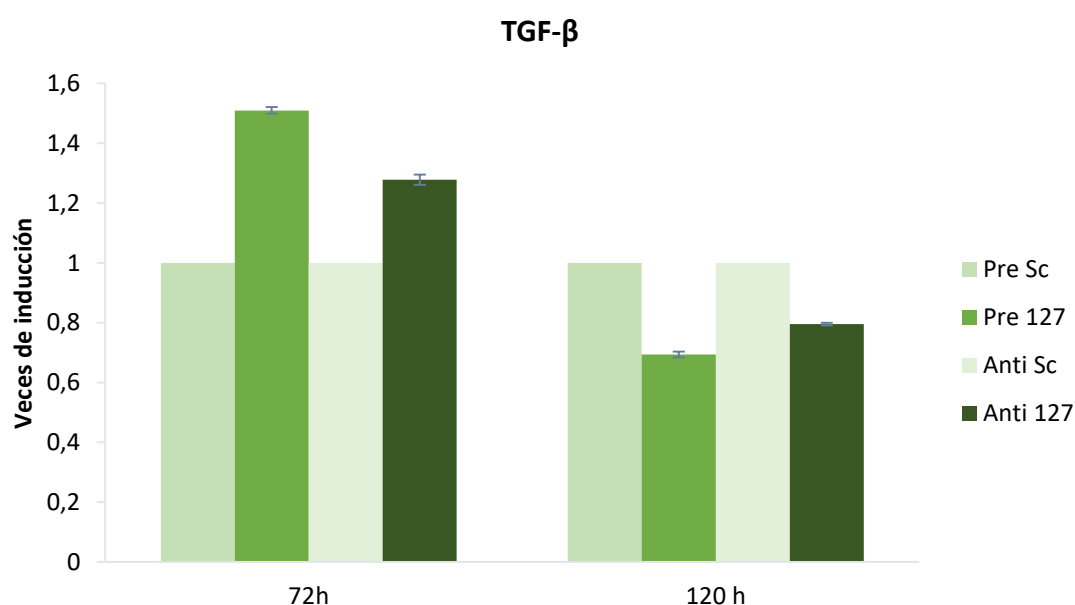


**Fig 17: Expresión de citoquinas en sobrenadantes de HK-2.** Mediante técnica de Array ELISA caracterizamos los sobrenadantes de los cultivos celulares de HK-2. Los resultados obtenidos para las citoquinas detectadas presentes en el kit, se agrupan en base a la menor expresión de las citoquinas en sobrenadantes de células en las que el miR-127 había sido sobreexpresado (A) y aquellas que se expresan más en sobrenadantes de células en las que se ha sobreexpresado el miR-127 (B). Los resultados del array son analizados con el software apropiado suplementado por la casa comercial, y posteriormente los datos son procesados con Microsoft Excel y CurveExpert 1.4. (C) Resumen de los resultados obtenidos en el Array.

En base a los resultados obtenidos y teniendo en cuenta el papel fundamental de TGF- $\beta$  en la TEM y la fibrosis renal, llevamos a cabo un ELISA específico del factor de crecimiento TGF- $\beta$ .

Los resultados recogidos en la figura 18 demuestran que a 72 horas de la transfección, las células en las que miR-127 está sobreexpresado secretan más TGF- $\beta$  al medio, con respecto a las que han sido transfectadas con el inhibidor del miRNA. Este efecto se pierde cuando se mantiene el cultivo hasta las 120 horas, coincidiendo con la pérdida de la modulación del miRNA. En este caso se detecta más TGF- $\beta$  en los sobrenadantes de las HK-2 cuyo miR-127 ha sido inhibido.

Estos resultados indican que la modulación de miR-127 en células proximales tubulares lleva a la modulación de la secreción de TGF- $\beta$ , con potenciales efectos en el microambiente fibrótico.



**Fig 18: Expresión de TGF- $\beta$  en sobrenadantes de HK-2.** Estudiamos la expresión de TGF- $\beta$  mediante ELISA específico para esta molécula, para determinar el efecto que tiene la modulación del miR-127 sobre la liberación de este factor de crecimiento profibrótico al medio extracelular. Observamos que a 72 horas de la transfección tanto la sobreexpresión del miR-127 como la inhibición del mismo hacen que TGF- $\beta$  aumente en el medio, en comparación a la cantidad detectada en los sobrenadantes con las células transfectadas con los irrelevantes respectivos.

De los cultivos de HK-2 que han sido transfectados, recolectamos los sobrenadantes para su posterior análisis, mediante RT-qPCR, de los miRNAs de la combinación identificada en el laboratorio en el contexto de daño renal.

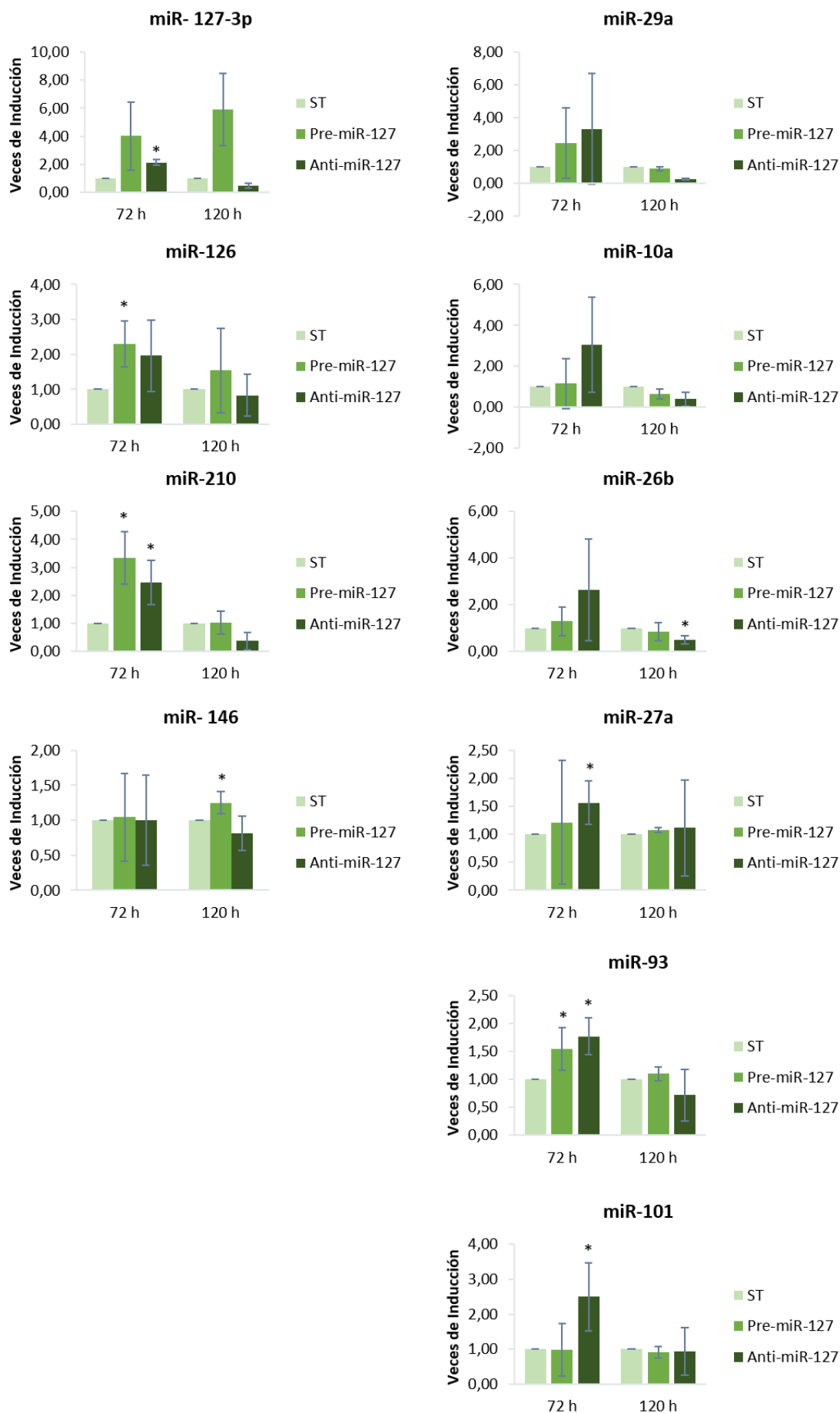
Por otro lado y dado que los miRNAs se secretan al medio extracelular y son señales celulares, quisimos determinar si la modulación de miR-127 en células proximales tubulares, implicaba la secreción de otros miRNAs al medio de cultivo. Por ello llevamos a cabo RT-qPCR de estos miRNAs.

En las gráficas de la figura 19 se representan los datos obtenidos.

En el caso de miR- 127, miR-126, miR-210 y miR-146 la sobreexpresión de miR-127 coincide con un aumento de la expresión de estos microRNAs en los sobrenadantes de las células, tanto a 72 como a 120 horas de la transfección de las células.

En el caso de los miRNAs: miR-29a, miR-10a, miR-26b, miR-27a, miR-93 y miR-101, estos se secretan en mayor cantidad cuando las células tienen inhibido el miR-127, a 72 horas de la transfección. A 120 horas la modulación de miR-127 no parece influenciar la secreción de estos miRNAs, que son detectados prácticamente en los niveles de las células no transfectadas utilizadas de control, o incluso su secreción disminuye en ambas condiciones de transfección, cuando la modulación de miR-127 se ha perdido.

Estos resultados indican que la modulación de miR-127 afecta la secreción de otros miRNAs al espacio extracelular, en el que pueden actuar como señales moduladoras del contexto fibrótico.



**Fig 19: Expresión de miRNAs en sobrenadantes de HK-2.** Partiendo de los sobrenadantes de HK-2 transfectadas durante 72 horas y 120 horas y mediante RT-qPCR, obtenemos el perfil de expresión de los miRNAs. Todos son detectados en suero, confirmando la secreción de estos miRNAs al medio extracelular por parte de las células epiteliales en las que se ha modulado miR-127. Se expresan como veces de inducción y según patrones diferentes. En base a la similitud en las tendencias de algunos de ellos, se agrupan en esta figura en dos paneles. En la izquierda los miRNAs: 127, 126, 210 y 146 que se detectan más en el sobrenadante de las HK-2 que tienen el miR-127 sobreexpresado y en la derecha los miRNAs: 101, 93, 27a, 26b, 10a y 29a que están más inducidos en el caso en el que se han transfectado las células con Anti-miR-127. Se considera estadísticamente significativo p-valor < 0,05 (\*)

### La modulación de miR-127- 3p en células epiteliales condiciona cultivos de fibroblastos

Determinamos si los sobrenadantes de células epiteliales tubulares donde se ha modulado miR-127, provocaban alguna afectación a los fibroblastos, en el intento de determinar si los miRNAs así como las citoquinas secretadas al medio tras modular miR-127 en las células epiteliales, pueden alterar y regular el microambiente.

En la figura 20A se recogen las imágenes representativas para los diferentes cultivos de fibroblastos realizados en este trabajo.

En primer lugar observamos la morfología e integridad del cultivo de fibroblastos, detectando diferencias entre el efecto provocado por el sobrenadante de las células epiteliales que no habían sido sometidas al estímulo profibrótico de TGF- $\beta$  con respecto a las que sí habían sido tratadas. En caso de no estar presente dicho estímulo, el cultivo de los fibroblastos mantiene más sus características e integridad de monocapa que en el caso en que las HK-2 habían sido cultivadas en presencia de TGF- $\beta$ .

Por otro lado se observa que la modulación de miR-127 en células epiteliales implica que su sobrenadante también afecta los fibroblastos del entorno, haciendo que empeore la monocapa en los casos en los cultivos condicionados con el sobrenadante de HK-2 que tenían el miR-127 sobreexpresado, y manteniéndose la integridad del cultivo en los que se había usado el sobrenadante de HK-2 donde miR-127 se había inhibido.

Además, mediante RT-qPCR, figura 20B, estudiamos la expresión del miR-127 en los fibroblastos con medio condicionado de 72 horas de las diferentes condiciones de transfección de HK-2. Para ambos tiempos se observa una mayor expresión de miR-127 en los fibroblastos cuyo medio de



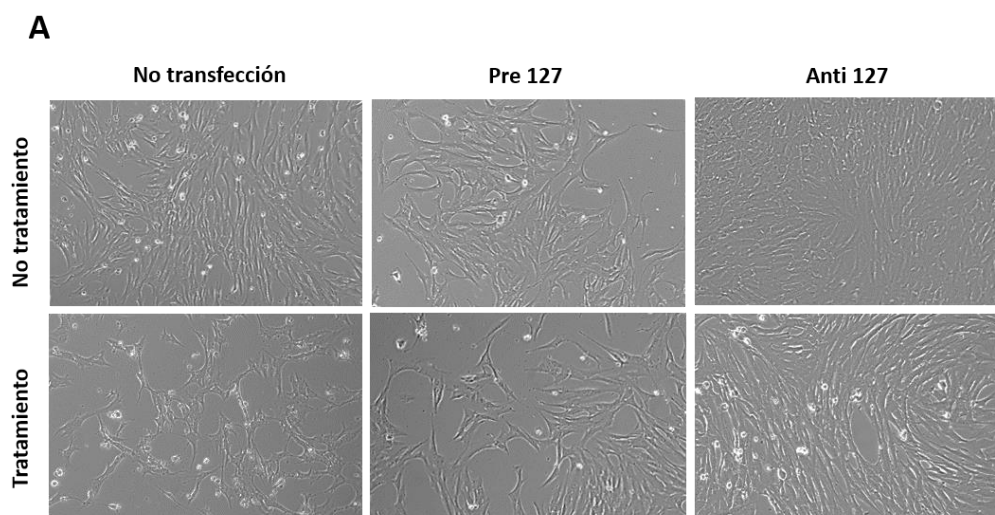
cultivo provienen de células epiteliales tubulares proximales en las que éste había sido sobreexpresado. Detectamos una menor expresión del miRNA en los fibroblastos crecidos en medios de HK-2 con miR-127 inhibido.

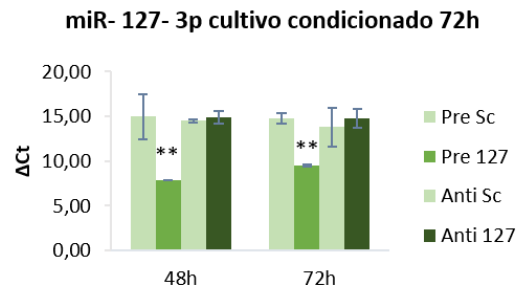
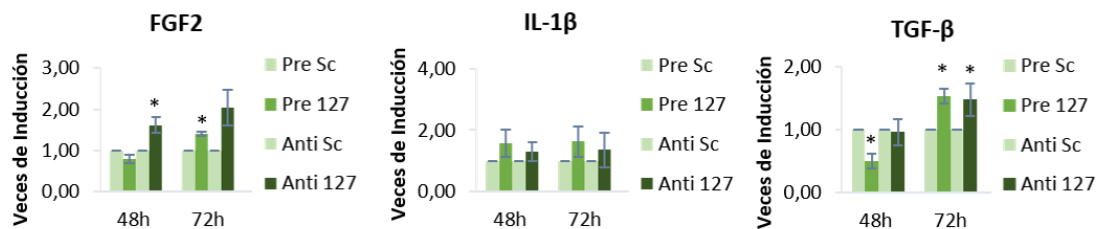
Estos resultados correlacionan con los obtenidos bajo el tratamiento con TGF- $\beta$ , en el que el miRNA tiende a disminuir su expresión en presencia del estímulo profibrótico, así como a aumentar marcadores de miofibroblastos y mantener la integridad del cultivo.

En este caso, entre los genes de activación estudiados, figura 20C, se detecta la IL-1 $\beta$ , que tiende a incrementarse en tiempos más largos del cultivo en los casos en los que hay inhibición del miR-127 en las células epiteliales.

Para otros marcadores de activación de fibroblastos como FGF2 y TGF- $\beta$  la tendencia parece observarse en tiempos más cortos y demuestran que la falta de miR-127 puede contribuir a la activación de fibroblastos.

Estos datos correlacionan de nuevo con la hipótesis de que miR-127 tiene un efecto protector de la fibrosis no sólo en células epiteliales impidiendo que transicionen, sino que influye en el resto de tipos celulares presentes en el riñón como fibroblastos, liberando señales moduladoras de la fibrosis.



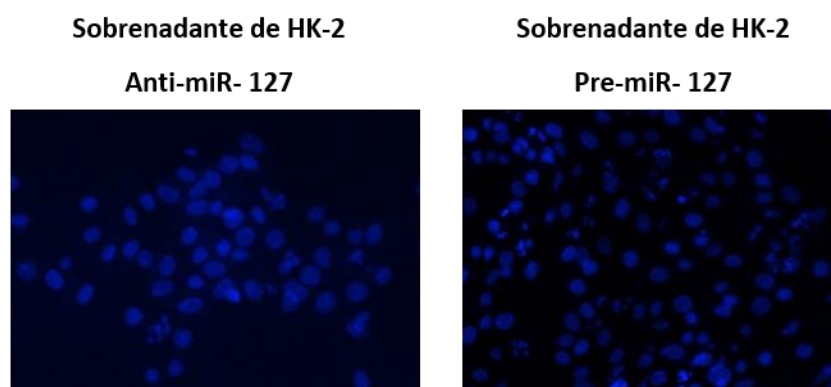
**B****C**

**Fig 20: Cultivos de fibroblastos NRK-49 F.** Utilizamos los sobrenadantes de las HK-2 transfectadas en los cultivos de fibroblastos. En las imágenes (A) se puede observar el aspecto del cultivo de las NRK-49 F condicionadas con los distintos sobrenadantes de las diferentes condiciones de HK-2. Estudiamos mediante RT-qPCR la expresión del miR-127 en los fibroblastos cultivados condicionados con el medio de las diferentes modulaciones del miRNA en HK-2 tras 72 horas de trasfección sobre 48 y 72 horas de cultivo de NRK-49F (B). Los resultados están representados el  $\Delta C_t$ s, con lo que podemos observar que para todos los tiempos, hay una mayor expresión del miR-127 en los fibroblastos que han sido cultivados con los sobrenadantes de HK-2 donde se había transfectado el Pre-miR-127. También estudiamos mediante RT-qPCR, genes de activación de fibroblastos, (C) para comprobar si la modulación del miR-127 tenía alguna implicación en la expresión de estos, que se representa en veces de inducción de cada condición específica con respecto a su irrelevante. Se considera estadísticamente significativo p-valor < 0,05 (\*) o < 0,01 (\*\*).

Con el fin de valorar si la expresión del miRNA-127 en los fibroblastos es debida a una modulación interna de la misma y no a una incorporación del miR 127 excedente, no integrado por las HK-2, realizamos un ensayo de pinocitosis usando Dextrano.

Según se observa en la figura 21 en ambas condiciones de fibroblastos cultivados con sobrenadantes de HK-2 en las que se había sobreexpresado e inhibido el miRNA, no hay captación de Dextrano, ni diferencias entre las condiciones, tomando como referenciado un control positivo de la técnica ya utilizado en nuestro laboratorio.

Con estos datos podemos concluir que la expresión del miRNA está modulada en las células NRK-49F por otros factores séricos que incluyen citoquinas y otros miRNAs, no por incorporación del excedente de miR-127 en los sobrenadantes.



**Fig 21: Niveles de pinocitosis en células NRK-49F.** Ensayo de endocitosis no mediada por receptores añadiendo Dextrano-FITC 70 kDa. Núcleos teñidos con DAPI. Imágenes tomadas con microscopio Nikon Eclipse-TE2000.

## Efecto de la modulación de miR-127-3p en fibroblastos NRK-49F

Dado que miR-127 se modula en células NRK-49F por cultivo con los sobrenadantes de HK-2 en las que el miRNA ha sido modulado, estudiamos el efecto de la modulación del miRNA directamente en los fibroblastos.

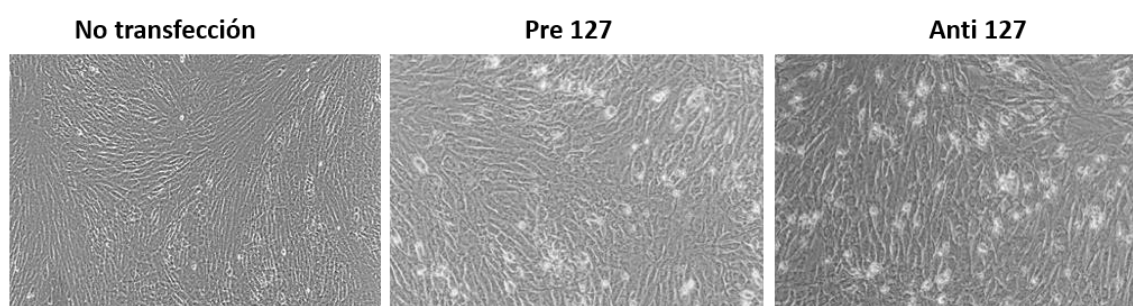
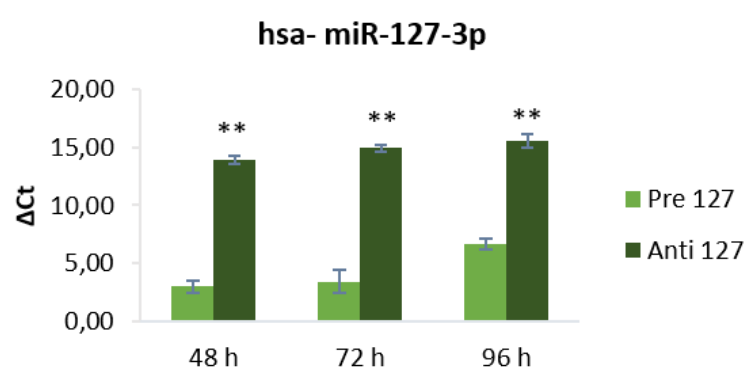
En la figura 22 A, se observan únicamente las alteraciones morfológicas propias del proceso de transfección, con respecto al cultivo sin transfectar utilizado de control. En la gráfica de expresión de miR-127-3p (B) se confirma la eficacia de transfección del miRNA, representándose los resultados de las RT-qPCRs en  $\Delta C_t$ s respecto al *scrambled*.

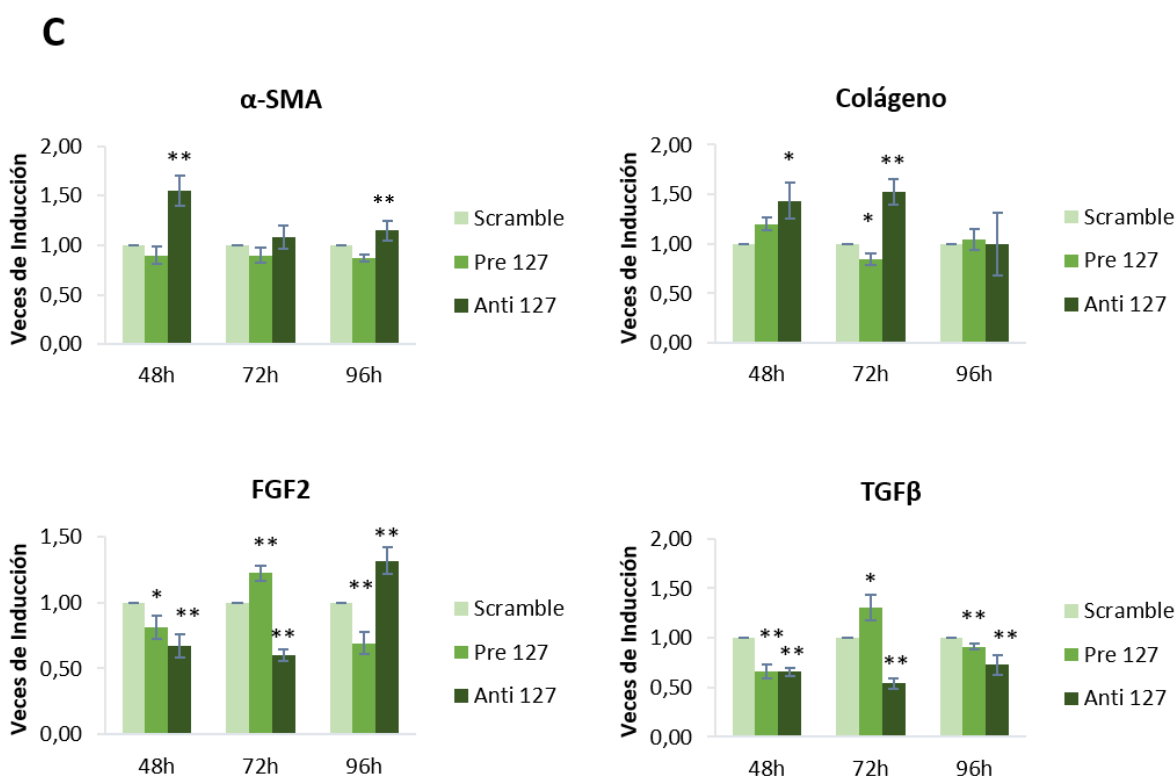
Con el fin de determinar si miR-127 produce alguna alteración a modo de activación de fibroblastos, determinamos mediante RT-qPCR, la expresión de genes como  $\alpha$ -SMA, colágeno, FGF2 y TGF- $\beta$  en los mismos.

Además de los representados en la figura 22 (C) se midieron IL-1 $\beta$  y PDGF, que resultaron no estar modificados en ninguna condición (datos no mostrados).

Los resultados indican que la expresión de  $\alpha$ -SMA y colágeno parecen estar potenciadas cuando está inhibido miR-127 y atenuadas en el caso de que el miRNA está sobreexpresado.

Estos resultados más los descritos para los cultivos condicionados de fibroblastos con sobrenadantes de células epiteliales, sugieren que miR-127 modulado directamente en fibroblastos, no modifica su respuesta, pero si puede participar en la señalización entre células epiteliales y fibroblastos, regulando el microambiente fibrótico.

**A****B**



**Fig 22: Transfección miR-127-3p en fibroblastos NRK-49 F.** Estudiamos el papel de miR-127 en los fibroblastos NRK-49F mediante transfección de Pre-miRs y Anti-miRs irrelevantes y específicos para dicho microRNA.

Como se observa en las imágenes (A) la transfección no afecta a la monocapa del cultivo de fibroblastos. Y se confirma mediante RT-qPCR que el miRNA ha sido eficientemente modulado (B). Se representa con  $\Delta$ Cts, de manera que un valor menor en los casos de Pre-miR-127, se corresponde con una mayor expresión del miRNA y viceversa.

El estudio de genes (C) característicos de células mesenquimales como  $\alpha$ -SMA y colágeno y otros de activación de fibroblastos como FGF2 y TGF- $\beta$ , se realiza por RT-qPCR y los resultados se representan en veces de inducción de las células que han sido transfectadas con respecto a un control sin transfectar. Se considera estadísticamente significativo p-valor < 0,05 (\*) o <0,01 (\*\*).

Ya que los fibroblastos también contribuyen al establecimiento de fibrosis, nos propusimos ver el efecto del tratamiento de TGF- $\beta$  en los fibroblastos.

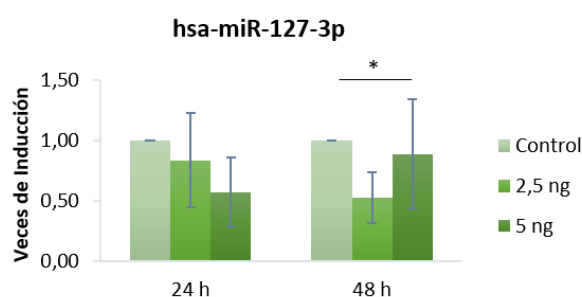
Para ello hemos utilizado la línea celular de fibroblastos renales de rata, NRK-49F, y estudiamos, mediante RT-qPCR, la expresión de miR-127 en las células tratadas con dos concentraciones

diferentes de TGF-  $\beta$  en comparación al control, sin tratamiento (vehículo). Observamos una clara tendencia en la que el miRNA está disminuido en presencia del estímulo de TGF- $\beta$ .

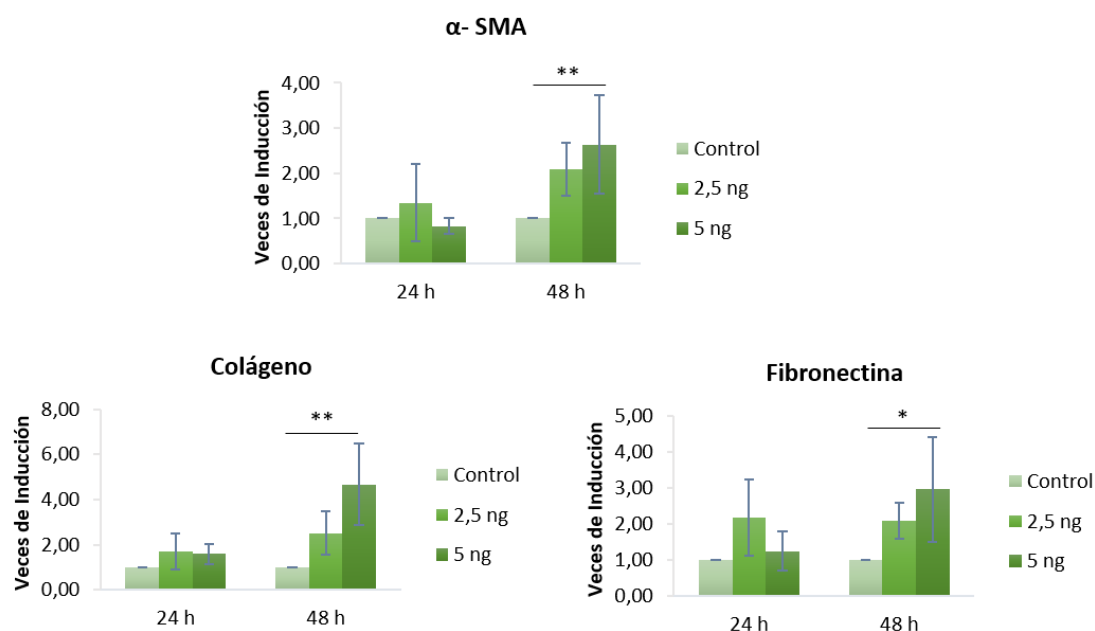
Estudiamos en paralelo y por RT-qPCR, la expresión de los genes asociados al contexto de TEM,  $\alpha$ -SMA, colágeno y fibronectina. Los resultados indican que el tratamiento con TGF- $\beta$  induce la expresión de los tres genes, indicando que TGF- $\beta$  confiere a los fibroblastos residentes en el parénquima renal características de miofibroblastos, tal y como se esperaba.

Ambos resultados indicarían que TGF- $\beta$  induce el mantenimiento y progresión de fenotipo fibroblástico mediado, entre otros mecanismos, por un descenso en los niveles de expresión de miR-127.

## A



## B



**Fig 23: NRK-49F tratadas con TGF- $\beta$  evolucionan hacia miofibroblastos.** Sometemos a los fibroblastos a dos concentraciones de TGF- $\beta$  para estudiar el efecto que tiene este estímulo profibrótico sobre los fibroblastos. Analizamos la expresión de miR-127 (A) mediante RT-qPCR y expresado en veces de inducción, observando que con el tratamiento hay menos expresión del miRNA que en el caso del cultivo control de fibroblastos sin tratar (vehículo). El estudio de genes específicos de células mesenquimales demuestra que bajo el tratamiento con TGF- $\beta$  en fibroblastos, hay más expresión de  $\alpha$ -SMA, Colágeno y Fibronectina. Se considera estadísticamente significativo p-valor < 0,05 (\*) o <0,01 (\*\*).

## Modelo murino de OUU para mimetizar daño renal crónico

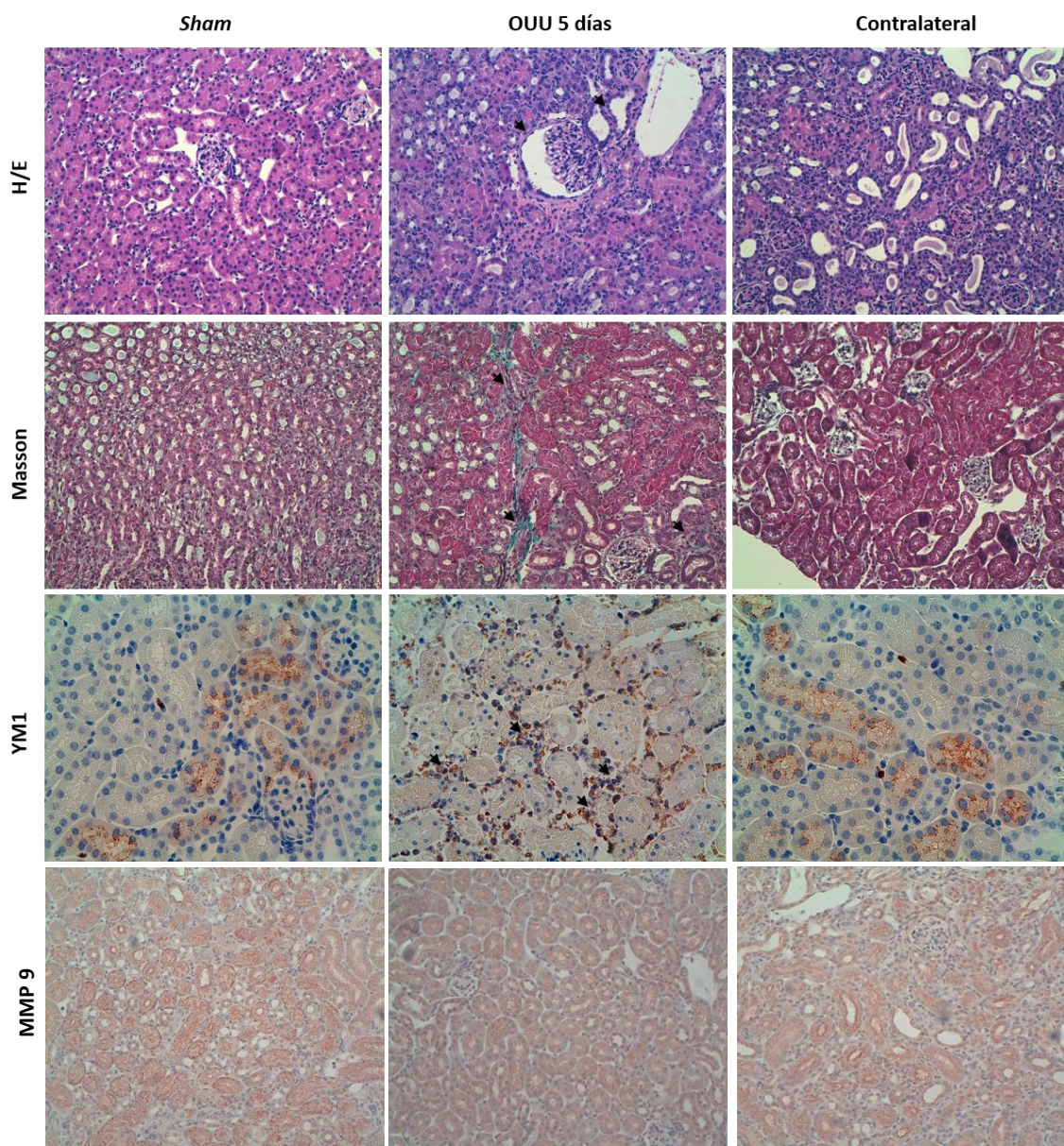
La fibrosis renal es la característica principal de la Enfermedad Renal Crónica, desencadenada tras la exposición prolongada a un daño o estímulo profibrótico.

Está establecido en la literatura que los modelos OUU (Chevalier *et al.*, 2009) y nefrectomía 5/6 (Shobeiri N *et al.*, 2010) mimetizan el daño renal crónico y se utilizan para su estudio in vivo. Para este trabajo seleccionamos el modelo murino de OUU, por su menor tasa de mortalidad y por su mayor similitud con el desarrollo de la patología en los pacientes humanos.

Para caracterizar este modelo y la fibrosis que induce, se emplean cortes de parafina de riñones y se realizaron: 1) tinciones de hematoxilina/ eosina para valoración de la histopatología renal, 2) tinción con tricómico de Masson para observación de depósitos de colágeno muy característicos de la fibrosis del tejido, 3) inmunohistoquímica de la proteína YM1 de macrófagos para comprobar la presencia de componente inflamatorio, ya que YM1 es un marcador expresado fundamentalmente por macrófagos M2, de tal manera que esta inmunohistoquímica también permite determinar el fenotipo de macrófagos en este modelo asociado a la fibrosis y 4) inmunohistoquímica de MMP9 como una de las metaloproteinasas implicadas y asociadas a la TEM en nuestro modelo.

En la figura se observa mayor desestructuración del parénquima renal coincidiendo con mayor acúmulo de colágeno e infiltrado inflamatorio en las muestras a 5 días de la intervención de OUU con respecto a su contralateral y aún más en comparación al Sham, lo que da validez al modelo para estudios experimentales de fibrosis y de daño renal crónico In Vivo.





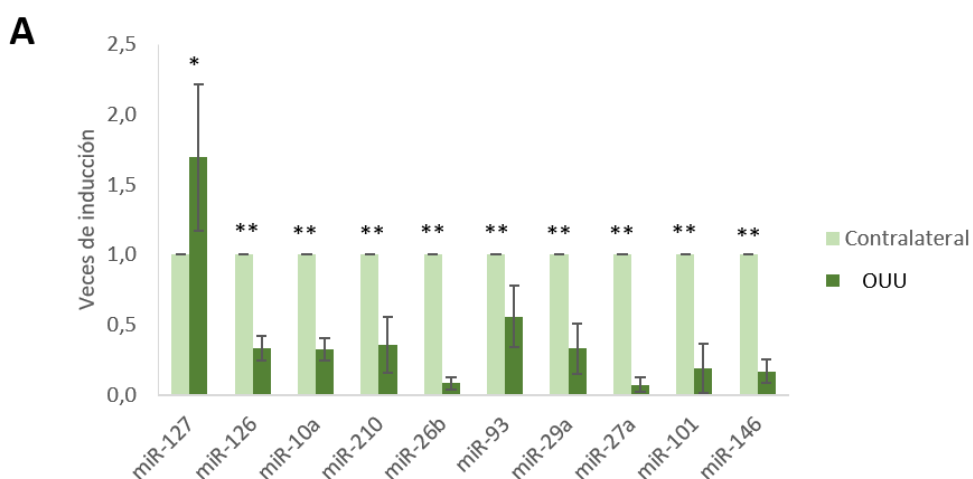
**Fig 24: Caracterización modelo OUU.** Imágenes de secciones de riñón en el modelo de UUO: ratón sham (derecha), obstrucción ureteral (centro), y contralateral (izquierda). Se han realizado tinciones de H/E, Masson e inmunohistoquímica para MMP9 e YM1. *Imágenes de H/E, Masson, MMP9 con magnificación 200x; YM1 magnificación 400x.* Así, secciones de tejido renal a 5 días tras la obstrucción ureteral exhiben atrofia tubular (H/E), depósito de matriz extracelular, incluyendo colágeno I en el parénquima renal (Masson), y presencia de infiltrado inflamatorio, en el que se han identificado macrófagos por inmunohistoquímica con YM1, así como aumento de expresión de MMP9.

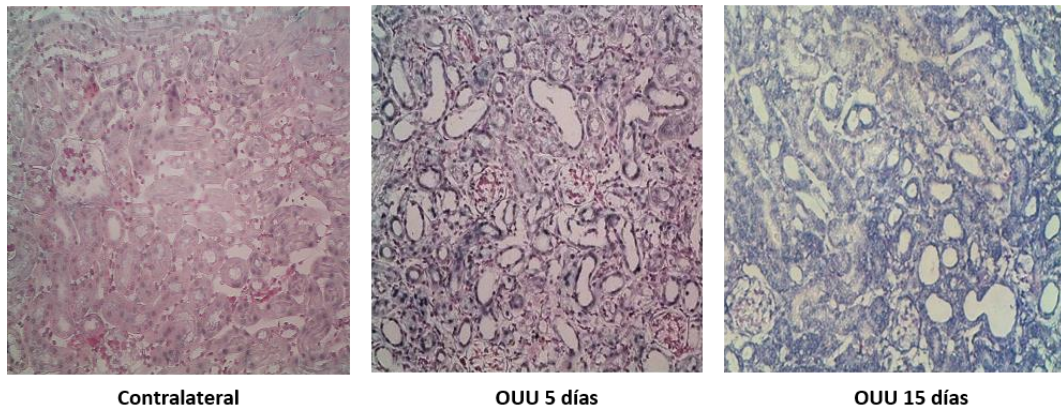


Utilizando este modelo in vivo, hemos determinado la expresión de los miRNAs de la combinación validada por estudios previos de nuestro laboratorio incluido el miR-127. Para miR-127 también hemos valorado su localización por hibridación In Situ.

Nuestros resultados de RT-qPCR indican que la expresión de miR-127 tiene un patrón diferente al del resto de los miRNAs. Observamos en la gráfica de la figura 25 que la expresión de miR-127 está inducida en el riñón sometido a OUU con respecto a su contralateral usado de control. El resto de miRNAs por el contrario, disminuyen su expresión en el riñón intervenido.

Además se ha confirmado la expresión y estudiado la localización de miR-127 por hibridación In Situ, en cortes parafinados de ambos riñones. A 5 días se correlaciona la mayor expresión de miR-127 en el riñón que se ha realizado la obstrucción con respecto a su contralateral e incluso a 15 días de la cirugía se sigue observando una gran expresión del miRNA en el riñón dañado con respecto al riñón que no había sido sometido a OUU.



**B**

**Fig 25: Expresión de miR-127 y otros miRNAs en el modelo de OUU en ratón.** RT- qPCR de la combinación de miRNAs en tejido renal del modelo murino. Para miR-127-3p, se observa inducción en riñón obstruído. (A) Imágenes de secciones de riñón contralateral (izda) y con obstrucción (dcha), en las que se ha realizado hibridación in situ de miR-127 y hay mayor marcaje en las imágenes correspondientes al riñón sometido a OUU. Magnificación 200x. (B) Se considera estadísticamente significativo p- valor < 0,05 (\*) o <0,01 (\*\*)

## miRNAs como biomarcadores de daño renal crónico en humanos

### Expresión de miRNAs en biopsias de pacientes transplantados

Las biopsias de los injertos se han clasificado en cuanto a la presencia de fibrosis y atrofia tubular clínica siguiendo los criterios de Banff. En esta estratificación se tienen en cuenta las características histopatológicas de fibrosis intersticial y atrofia tubular. Se diferencian tres grados: I (leve): fibrosis intersticial y atrofia tubular 6- 25%; II (moderado): fibrosis intersticial y atrofia tubular 26- 50%; III (severo): fibrosis intersticial y atrofia tubular >50%.

Para este trabajo se utilizan biopsias de injertos renales con distintos grados de fibrosis tal y como aparece en la tabla 4 y se valora mediante RT-qPCR la expresión de los miRNAs de la combinación patentada por nuestro laboratorio en pacientes de FRA.

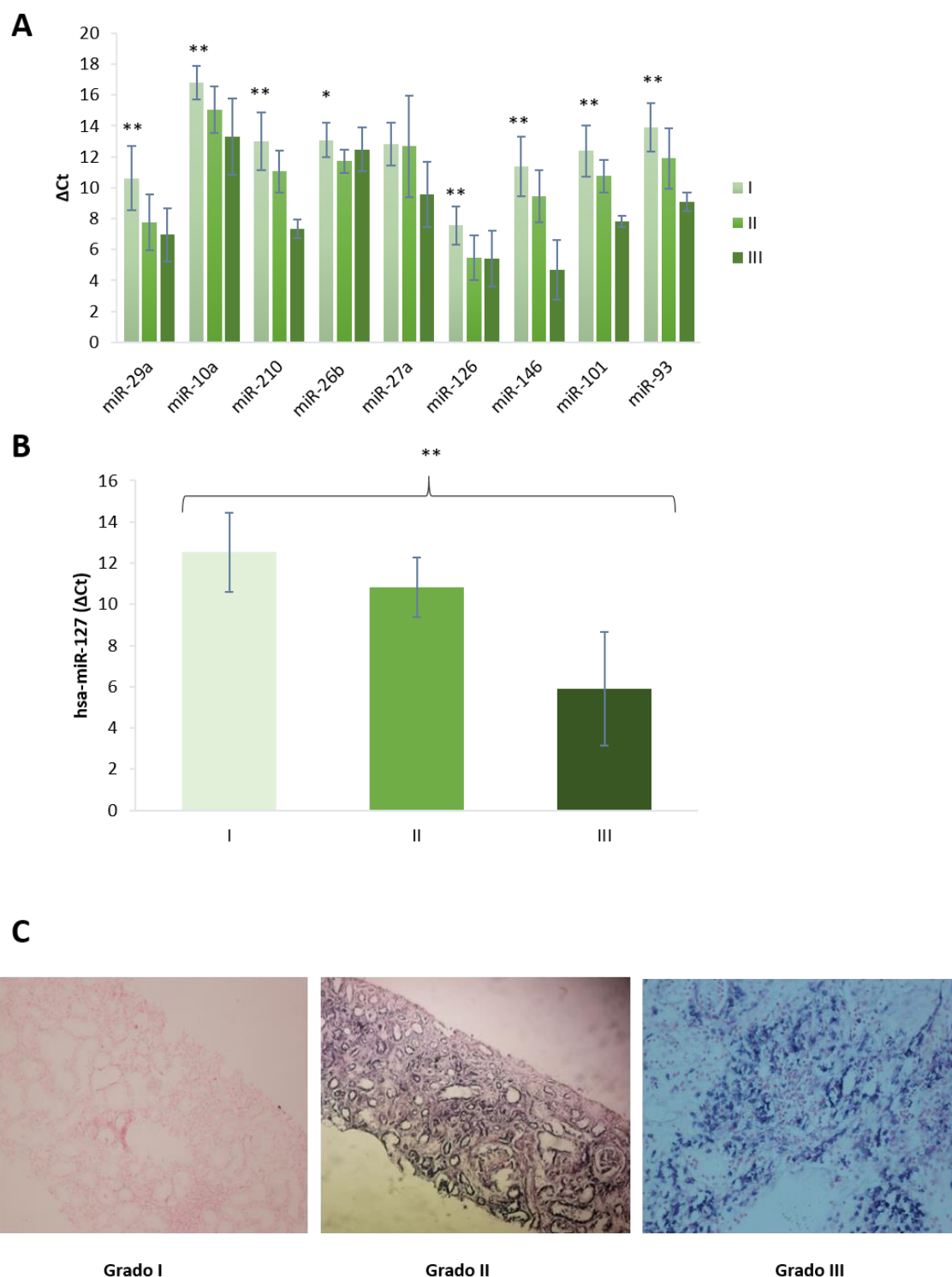
	GRADO I	GRADO II	GRADO III
	M3 F15	M1 F15	M2 F15
	M5 F15	M4 F15	M6 F15
	M7 F15	M10 F15	M3 J16
	M8 F15	M11 F15	
	M9 F15	M12 F15	
	M13 F15	M15 F15	
	M16 F15	M17 F15	
	M14 F15	M19 F15	
	M2 J16	M1 J16	
	M1 F16	M4 J16	
	M2 F16	M8 F16	
	M3 F16		
	M4 F16		
	M5 F16		
	M6 F16		
	M7 F16		
	M9 F16		
<b>TOTAL:</b>	<b>17</b>	<b>11</b>	<b>3</b>

**Tabla 4: Biopsias injertos renales clasificadas por el grado de fibrosis intersticial y atrofia tubular según la clasificación BANFF.**

Teniendo en cuenta que los datos se representan en diferencial de Cts con respecto al gen control 5S, las gráficas de la figura 26 A, representan una mayor expresión, conforme mayor es el grado de fibrosis, de la mayoría de los miRNAs de la combinación, excepto el miR-26b y el miR-126, que tienen un patrón de expresión diferente, si bien hay aumento de su expresión de grado I a grado II.

Considerando que el miR-127-3p correlaciona con el grado asignado a la biopsia por la clasificación Banff, figura 26 B, nos proponemos valorar su expresión en el propio tejido de las muestras disponibles para ello se muestran imágenes en el apartado C representativas de la

presencia del miRNA en biopsias clasificadas de grado III y II, en contraposición a las de grado I en las que no se observa señal tras la hibridación In Situ.



**Fig 26: Expresión de miRNAs en Biopsias de injertos con fibrosis renal.** Se analiza la expresión de los miRNAs de la combinación identificada en el laboratorio (A) mediante RT-qPCR a partir de biopsias

humanas parafinadas. Los resultados se representan en  $\Delta$ Cts y en ellos observamos que hay una mayor expresión de los miRNAs, coincidiendo con un mayor grado de daño renal, exceptuando el miR-26b y el miR-126, que no cambian su expresión o incluso aumenta un poco en el caso del miR-26b en los grados II y III con respecto al I. En caso del miR-127-3p (B), los datos indican que miR-127 aumenta su expresión con la severidad del daño. Este hecho se confirma mediante hibridación In Situ en cortes de parafina de las biopsias (C), pudiendo detectarse más expresión de este miRNA en el grado III y II en comparación al grado I.

### miRNAs como potenciales biomarcadores de ERC.

Tal y como hemos demostrado en esta tesis, miR-127 tiene un papel importante en el desarrollo de daño renal crónico. miR-127 y otros miRNAs son secretados a medio extracelular, lo que indica que podrán ser detectados en suero de pacientes con ERC.

Determinamos los miRNAs de la combinación identificada en nuestro laboratorio, mediante RT-qPCR, en una cohorte de pacientes con ERC seleccionados para este estudio, según se ha descrito en la sección de materiales y métodos.

Los resultados fueron expresados como  $\Delta$ Cts (Ct miRNA- Ct Spike In) tal y como aparecen en la tabla 5.

Nuestros resultados indican que muchos de estos miRNAs son detectados en los sueros de los pacientes con ERC y que existen diferencias entre los pacientes y entre los propios miRNAs. Además, algunos miRNAs como miR-10a y miR-27a no son detectados en el suero de estos pacientes, indicando que el patrón de miRNAs asociado a FRA varía, como era de esperar, en los pacientes con ERC.

Num.	Muestra	miR_29a	miR_10a	miR_127	miR_210	miR_26b	miR_27a	miR_126	miR_146	miR_101	miR_93
1	PAC 1	19,43	26,21	20,73	18,34	25,69	23,26	16,76	18,83	26,21	20,40
2	PAC 2	18,35	26,21	24,08	17,90	23,37	22,09	16,04	18,18	17,75	21,35
3	PAC 3	16,61	25,37	20,57	17,63	21,11	20,52	15,01	17,03	16,65	21,02
4	PAC 4	18,75	24,90	23,35	17,67	21,91	24,38	15,78	18,94	17,02	20,57
5	PAC 5	18,67	26,21	22,80	19,26	24,11	24,96	17,36	18,55	18,08	21,31
6	PAC 6	17,46	25,17	21,32	17,58	20,74	22,48	15,74	17,92	16,33	21,06
7	PAC 7	17,85	26,21	22,29	18,18	22,19	22,10	15,80	18,08	16,97	20,53
8	PAC 8	19,63	26,21	22,25	17,24	24,66	24,31	17,17	18,53	18,74	22,39
9	PAC 9	16,96	25,54	21,46	17,78	21,80	22,56	15,33	18,14	16,31	20,43
10	PAC 10	16,56	24,01	23,28	17,15	19,06	20,33	14,48	17,63	15,12	20,48
11	PAC 11	17,70	24,96	22,99	16,92	19,59	20,29	14,30	17,12	14,28	19,36
12	PAC 12	17,70	24,31	22,74	18,04	20,69	21,89	14,81	17,79	16,48	22,61
13	PAC 13	-13,62	24,27	23,75	17,35	16,19	25,36	14,34	17,52	—	19,97
14	PAC 14	16,41	24,41	20,86	18,44	19,28	20,14	14,47	17,50	15,66	19,53
15	PAC 15	19,17	25,24	21,58	18,94	19,66	21,79	14,84	17,85	17,68	21,39
16	PAC 16	19,25	26,21	26,21	18,19	24,36	26,18	17,68	19,47	17,84	20,15
17	PAC 17	18,55	25,58	21,33	18,49	23,45	21,88	15,65	17,89	17,71	23,35
18	PAC 18	17,82	23,53	21,42	19,34	23,47	21,58	16,69	19,03	20,44	19,54
19	PAC 19	20,35	26,21	22,93	17,79	22,29	25,64	17,20	19,25	18,16	24,10
20	PAC 20	17,62	25,18	21,70	17,93	19,25	19,99	14,27	17,24	15,75	19,93
21	PAC 21	17,47	23,95	21,99	18,34	19,61	23,20	14,80	17,54	16,69	23,93
22	PAC 22	18,84	24,46	20,30	18,12	20,33	22,14	14,85	17,02	16,17	19,59
23	PAC 23	17,49	24,80	20,54	18,19	20,75	22,13	15,16	17,43	16,91	22,19
24	PAC 24	19,40	26,21	23,78	20,28	20,45	22,40	14,36	18,75	16,69	21,09
25	PAC 25	16,56	23,85	20,51	18,27	19,89	19,93	15,08	17,23	15,95	22,12
26	PAC 26	19,07	25,47	23,43	18,51	21,85	23,24	16,84	19,12	17,33	—
27	PAC 27	21,26	26,21	23,49	19,93	21,74	18,04	15,58	19,27	17,46	21,88
28	PAC 28	15,19	25,47	18,86	15,92	19,84	23,62	14,53	15,67	14,70	19,95
29	PAC 29	17,45	23,24	23,11	18,55	20,30	22,37	14,72	17,61	16,32	21,87
30	PAC 36	17,55	25,18	21,96	19,59	20,68	21,59	15,82	19,04	18,34	21,83
31	PAC 39	16,55	23,77	23,65	14,80	20,46	20,79	14,63	17,49	16,88	—
33	PAC 31	17,84	26,21	20,68	18,41	21,83	20,15	16,03	18,75	17,77	22,94
34	PAC 32	18,02	25,10	20,45	18,63	20,63	19,46	15,19	17,26	17,55	22,52
35	PAC 37	16,44	25,15	19,07	18,01	18,85	18,18	13,77	16,17	16,44	20,44
36	PAC 38	16,27	22,89	20,16	18,63	20,04	17,73	14,46	17,34	17,37	21,53
37	PAC 41	13,75	23,04	19,70	17,01	16,38	14,84	12,56	14,87	13,92	17,58
38	PAC 42	9,91	23,95	19,25	11,41	11,85	10,79	7,89	10,62	7,09	12,70
39	PAC 43	9,02	23,72	19,69	8,63	10,66	10,79	7,42	10,15	5,62	10,12
40	PAC 44	9,78	23,71	20,11	11,30	11,23	10,31	7,96	10,08	7,81	12,07

**Tabla 5: Expresión de miRNAs en suero de pacientes con ERC.** Los miRNAs fueron determinados por RT-qPCR y los valores son expresados en  $\Delta$ Cts en relación al Spike In (UniSp2).

Usando el software SPSS realizamos las correlaciones estadísticas entre la expresión de los miRNAs y las características clínicas de los pacientes del estudio, que figuran en la tabla 6.

Consideramos diferentes variables de interés para los pacientes con ERC como: etiología, hábito de tabaco y patologías asociadas a la ERC como diabetes, dislipemias e hipertensión arterial.

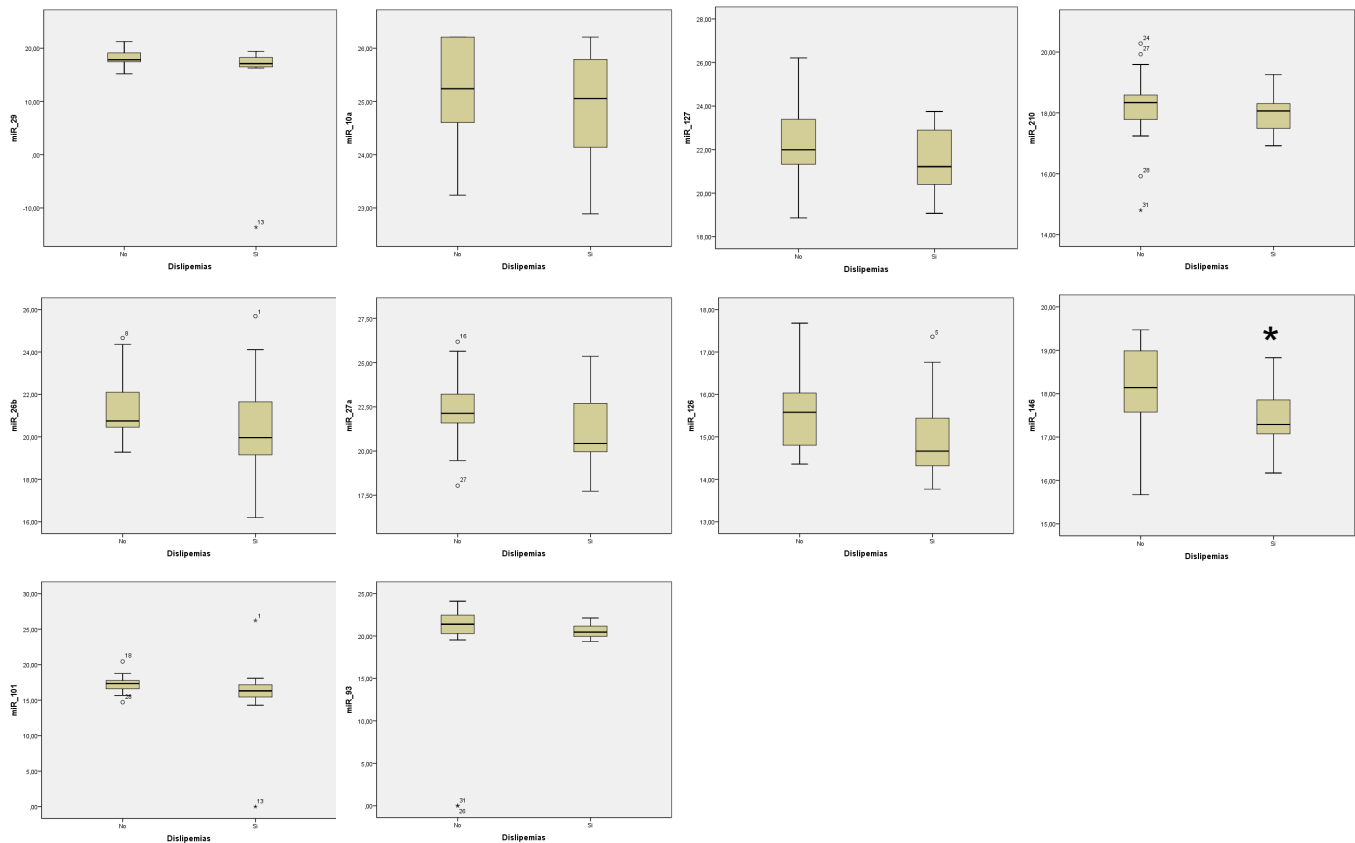
	Estadio 5 ERC (n=36)	Estadio <5 ERC (n=4)
Edad (años)	65,72 ± 16,001	N/C
Hombres (n, %)	25 (69,44%)	N/C
Mujeres (n, %)	11 (30,56%)	N/C
<b>Etiología ERC</b>		
Causa desconocida	3	N/C
Nefroangioesclerosis	4	N/C
Nefropatía diabética	9	N/C
Glomerulonefritis	9	N/C
Otras	11	N/C
<b>HTA</b>		
Sí	27	N/C
No	4	N/C
Desconocido	5	N/C
<b>Hábito de tabaco</b>		
Sí	8	N/C
No	11	N/C
Ex	11	N/C
Desconocido	6	N/C
<i>N/C: No Consta</i>		

**Tabla 6: Características clínicas de los pacientes con ERC utilizadas en este estudio.**

Para este trabajo se utilizó una cohorte de 40 pacientes con diferentes estadios de enfermedad renal crónica según la clasificación *KDIGO*. Se muestran en la tabla las características de los pacientes que se tuvieron en cuenta para establecer las correlaciones estadísticas con los resultados obtenidos de las PCRs de miRNAs en suero según se describe en otros apartados.

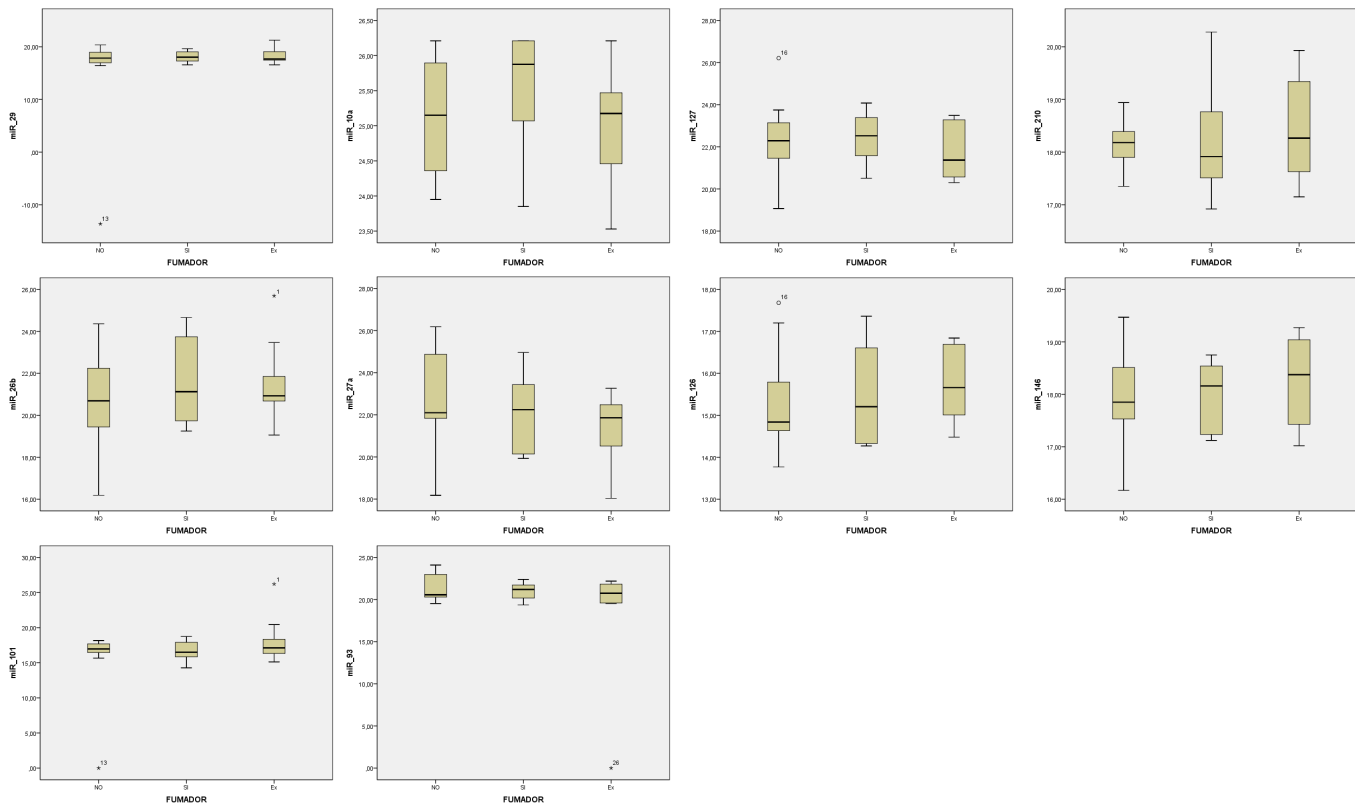
A

DISLIPEMIAS



B

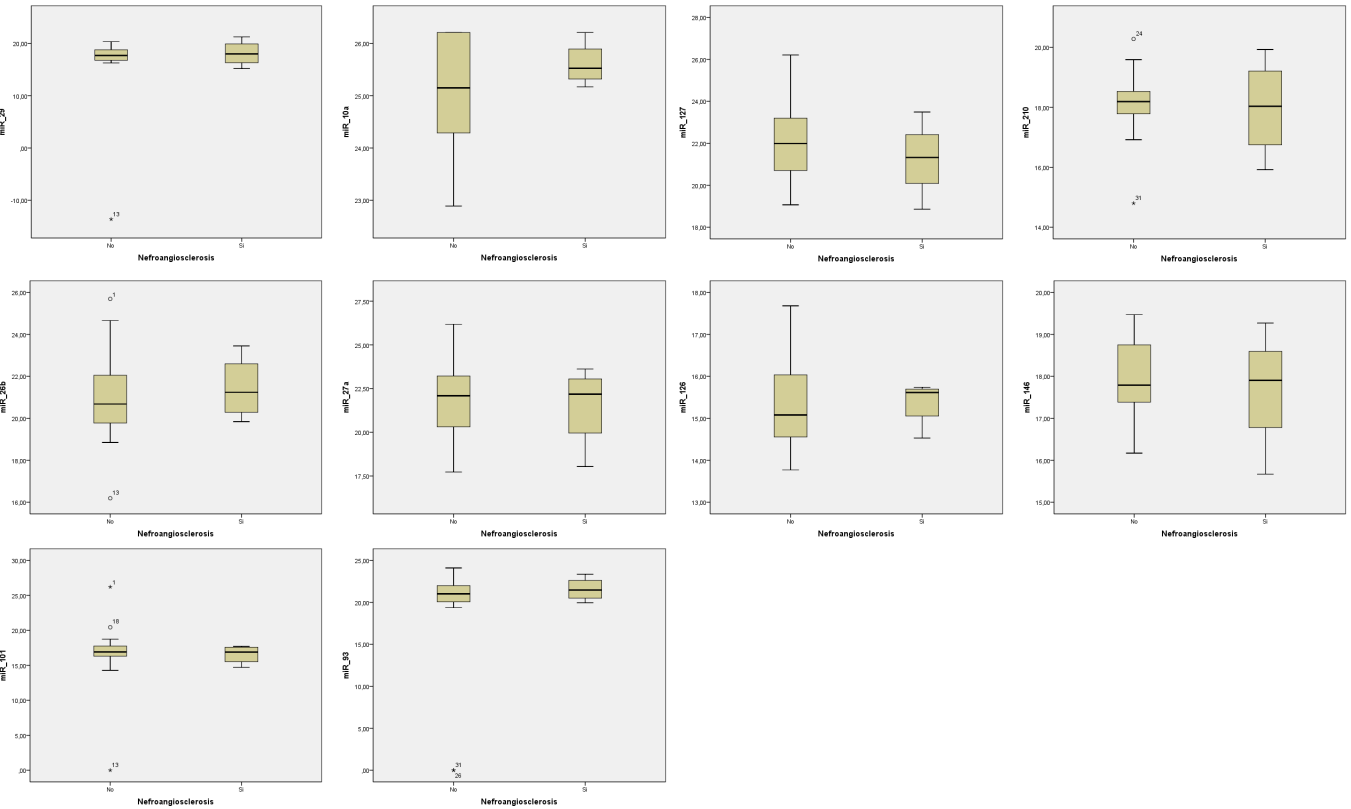
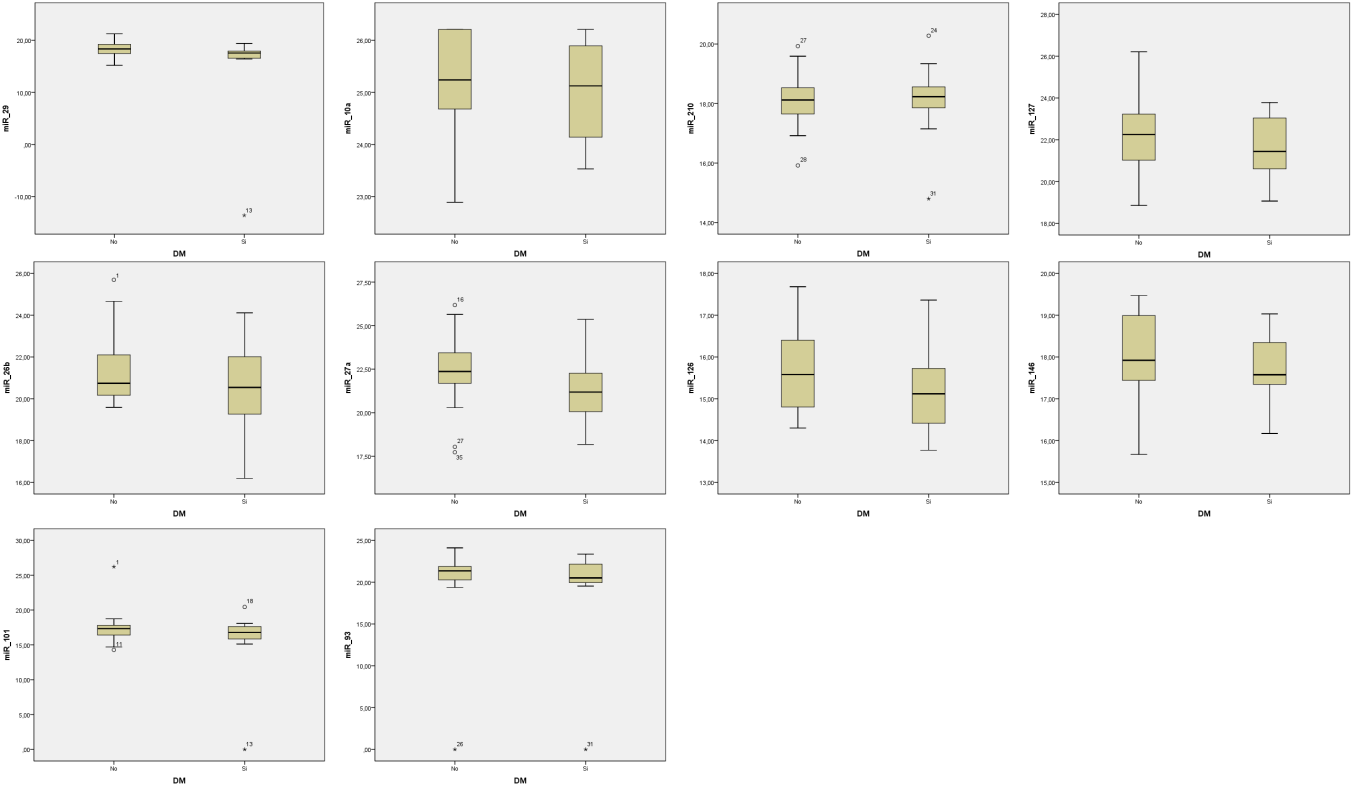
HÁBITO DE TABACO

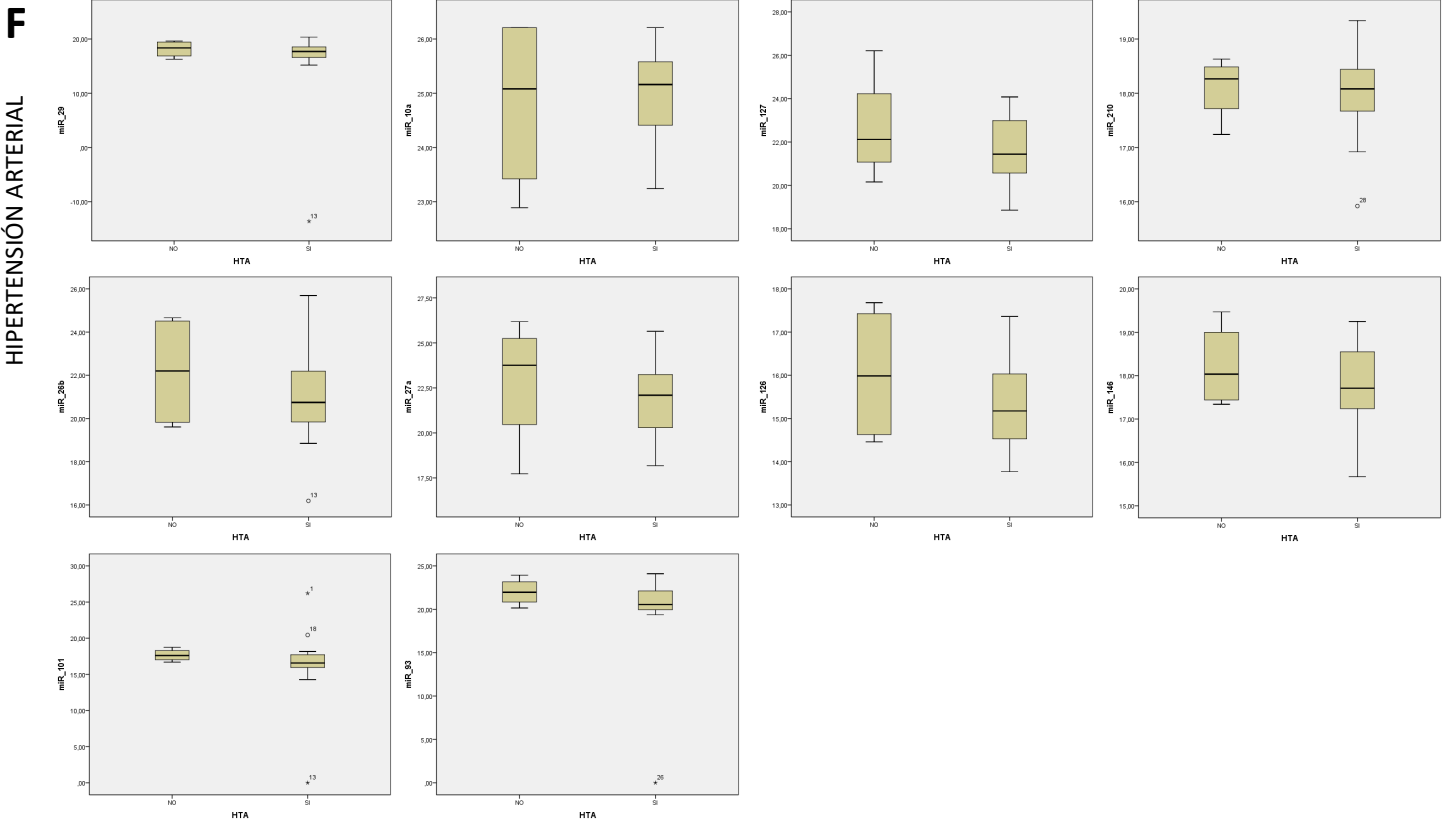
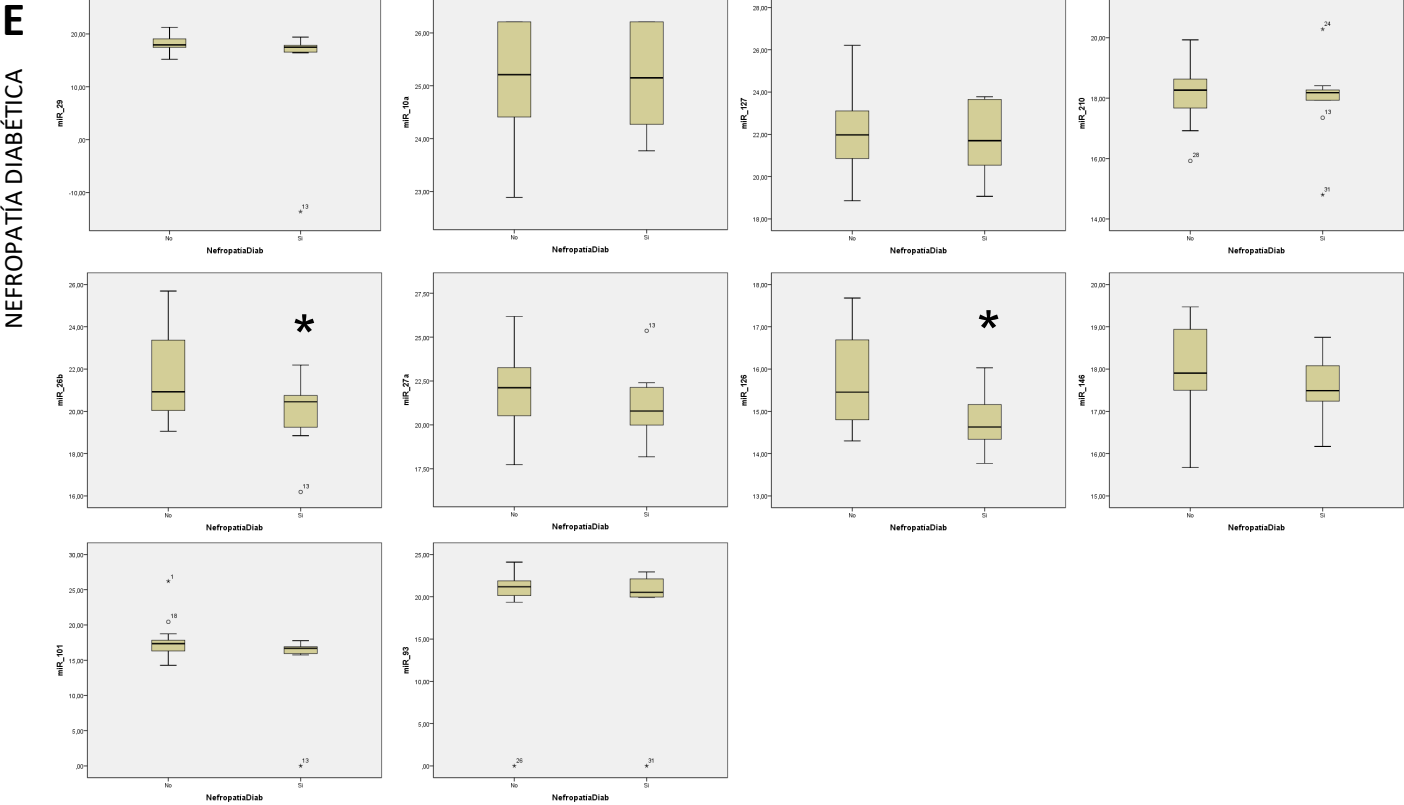


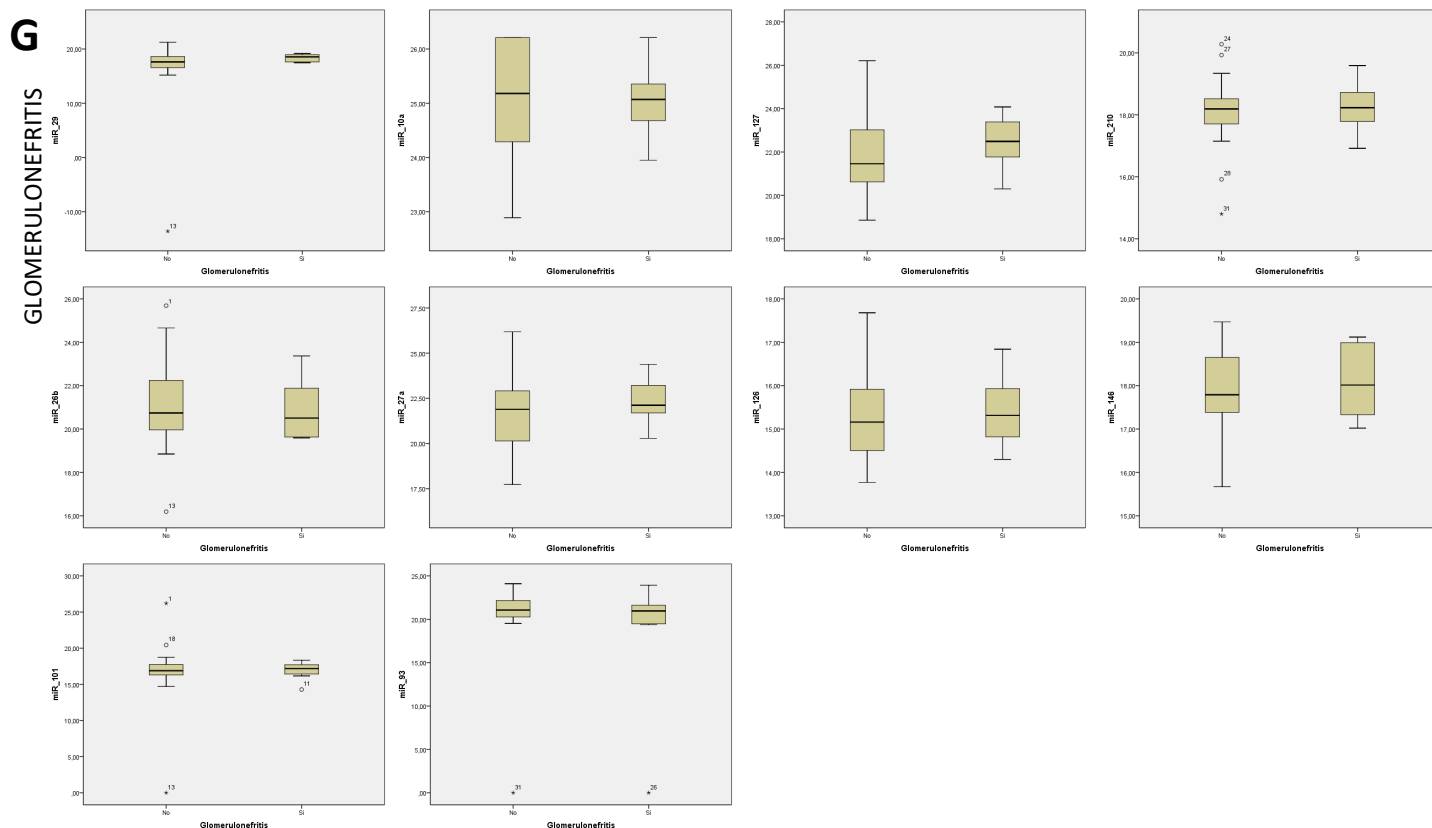


DIABETES MELLITUS

NEFROANGIOSCLEROSIS







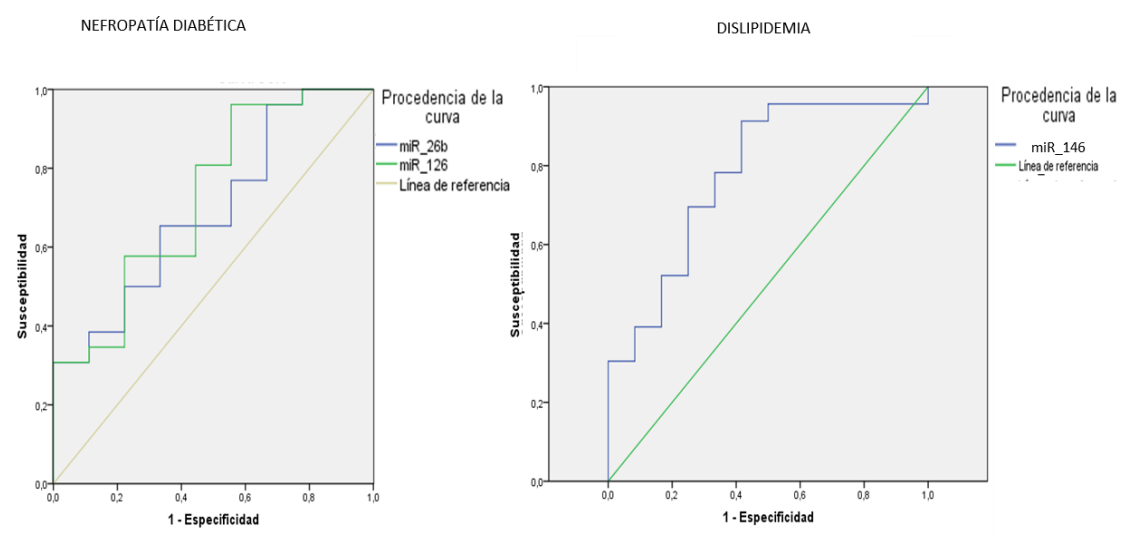
**Figura 27: Niveles de miRNAs en suero de pacientes de ERC, en correlación con sus características clínicas.**

Los niveles de miR-127, miR-101, miR-210, miR-126, miR-10a, miR-93\*, miR-146a, miR-29a, miR-26b y miR-27a fueron analizados en sueros de pacientes con ERC por RT-qPCR. Se realizaron análisis estadísticos teniendo en cuenta diferentes variables clínicas: (A) Dislipidemia, (B) Diabetes Mellitus (C) Glomerulonefritis, (D) Hipertensión Arterial, (E) Tabaco, (F) Nefropatía Diabética y (G) Nefroangiosclerosis.

Los niveles de los miRNAs en suero son expresados como valores de  $\Delta C_t$  y los datos se representan como rango de media e intercuartiles. Los asteriscos indican significancia estadística (\*P<0,05).

Para estudiar el potencial valor diagnóstico de estos miRNAs como asociados a nefropatía diabética y dislipemia, se realizaron análisis de curva ROC que indican especificidad y sensibilidad de biomarcador.

Sólo los miRNAs que resultaron significativos en la figura anterior se tienen en cuenta para este estudio.



**Figura 28: Valor diagnóstico de miR-26b, miR-126, miR-146 en pacientes con ERC asociada a nefropatía diabética y dislipemia.** Análisis de curva ROC fueron realizados comparando los pacientes que tienen nefropatía diabética y dislipemias con aquellos que no.

	NEFROPATÍA DIABÉTICA		DISLIPIDEMIA	
	AUC	p-value	AUC	p-value
miR-26b	0.692	0.035		
miR-126	0.729	0.045		
miR-146			0.779	0.023

**Tabla 7: Área bajo la curva (AUC) en análisis ROC de miRNAs estimados en suero de pacientes de ERC.**

Según los análisis estadísticos, miR-146 resultó significativo entre pacientes con y sin dislipemias mientras que miR-26b y miR-126 lo fueron para pacientes con nefropatía diabética.

Estos resultados indican que la expresión de miRNAs en suero de pacientes varía en función de las características de pacientes y que algunos pueden asociarse a algunas características clínicas, sugiriendo que estos miRNAs pueden ser biomarcadores útiles para la estratificación de pacientes de ERC, si bien una cohorte con mayor número de pacientes deberá analizarse para validar estos resultados.

## Discusión

En estudios previos de nuestro laboratorio se identificó una combinación de miRNAs como biomarcadores diagnósticos y predictivos de FRA con potencial utilidad en la práctica clínica. Además, otros resultados han demostrado que tras la normalización de la creatinina que confirma la reversión del daño renal, algunos de ellos, incluidos el miR-127 y miR-146, permanecían alterados en el tiempo, poniendo de manifiesto posiblemente un daño renal subyacente, no indicado por la creatinina (Aguado-Fraile et al., 2012; Aguado-Fraile et al., 2015).

Se ha demostrado que un episodio de FRA puede desencadenar alteraciones a largo plazo, entre ellas y como más severa, el daño renal crónico. Es conocido que la Enfermedad Renal Crónica, al margen de su etiología, se caracteriza por el desarrollo de fibrosis tubulo-intersticial y atrofia tubular, como principales eventos (Angela C Webster et al., 2017, Gomez IG et al., 2016) por lo que en este trabajo, hemos caracterizado el papel de miR-127 en daño renal crónico, como importante mediador y protector de TEM, uno de los mecanismos descritos subyacentes a la fibrosis junto con la proliferación y activación de fibroblastos.

Para el estudio de esta TEM, clásicamente, se han utilizado modelos celulares in vitro con tratamiento con TGF- $\beta$ , un estímulo profibrótico ampliamente descrito en la bibliografía (Vega et al., 2016). Y a su vez, se ha demostrado que los miRNAs son reguladores transcripcionales críticos en la respuesta celular a estímulos y pueden ser secretados al medio extracelular, proceso que puede estar modulado por TGF- $\beta$  (Wei Chen, 2016), y de esta manera, verse afectadas las células del entorno que modifican su fenotipo (Maria Ángelica Cortez, 2009). Además, se ha descrito que los miRNAs son reguladores claves de la señalización dependiente de TGF- $\beta$  y miembros de la familia TGF- $\beta$  y sus vías de señalización están regulados por miRNAs (Vishal Patel, 2012), lo que sugiere un bucle de retroalimentación autorreguladora entre el TGF- $\beta$  y miRNAs en la generación de fibrosis renal (Lorenzen JM, 2011), y que podría condicionar las diferencias en los patrones de expresión de los miRNAs según el estadio en el que se encuentren las células.

En nuestro trabajo, hemos utilizado un modelo in vitro de estimulación de células proximales tubulares con TGF- $\beta$  como modelo de inducción de TEM y hemos observado que el patrón de expresión es diferente para cada uno de los miRNAs estudiados y según la concentración del tratamiento, salvo en el mayor tiempo de mantenimiento del cultivo, en el que por lo descrito en la bibliografía, el tratamiento de TGF- $\beta$  exógeno podría actuar sobre la maquinaria de biogénesis de los miRNAs (Yang P, 2016) y verse alterada la expresión de los miRNAs en general.

Centrándonos en el efecto que pueda tener TGF- $\beta$  sobre la expresión de miR-127, concluimos que su expresión no es concentración ni tiempo dependiente, en concentraciones de TGF- $\beta$  de

0.1, 1, 2.5 y 10 ng. Esto añadido a la expresión de los genes seleccionados para el estudio de TEM en las células epiteliales, nos llevó a replantear el modelo in vitro y ajustar las condiciones de tratamiento y además ampliar el número de genes característicos de TEM a determinar, en consonancia con otros trabajos, para el estudio de TEM en el contexto de daño renal crónico (Allouch S et al., 2017).

Con el tratamiento de 5ng de TGF- $\beta$ , en células HK-2, los genes característicos del fenotipo epitelial como la E- Cadherina y otros del fenotipo mesenquimal como  $\alpha$ -SMA, Vimentin y FSP-1, seguían el patrón de expresión correspondiente a la TEM parcial descrita en los modelos de fibrosis renal (Vega G. et al., 2016), con lo que tomamos estas condiciones como nuestro modelo de TEM, y procedimos a analizar los miRNAs de la combinación previamente identificada para fracaso renal agudo, en nuestro laboratorio. Nuestros resultados indican que el tratamiento con 5 ng parece inducir todos los miRNAs de la combinación a tiempos de 24 y 48 horas, pero como era de esperar, se generan patrones diferentes para cada uno de ellos y también para las diferentes concentraciones de TGF- $\beta$ . Es característica la disminución de la expresión de todos ellos menos de miR-29 a 48 horas del tratamiento y que difiere de algunos estudios publicados hasta el momento, en los que se ha observado la inhibición de miR-29 por parte de TGF- $\beta$ , en el contexto de fibrosis pulmonar (Cushing L et al., 2011) o infarto cardiaco (van Rooij E et al., 2008) e incluso en modelos murinos de OUU. Su regulación en la fibrosis renal, no está bien establecida, pues en algunos estudios describen su inhibición mediada por Smad3 pero no por Smad2, en fibroblastos embrionarios de ratón y en células epiteliales NRK-52E (Qin W et al, 2011), por lo que el aumento que se observa en nuestro caso se explicaría con la implicación de otras moléculas de la señalización celular de TGF- $\beta$ , cuya función se ha descrito que puede variar según el tejido y la epigenética de las células (Roberts AB et al., 2003) y también teniendo en cuenta el patrón de expresión de miRNAs célula y tejido específico.

En cuanto a miR-127, su expresión se induce con el tiempo de tratamiento como ocurre con otros miRNAs. TGF- $\beta$  se ha relacionado previamente con miR-127 (Jiang H et al., 2014) y en nuestro trabajo observamos que miR-127 parece inducirse en un contexto con TGF- $\beta$  como estímulo profibrótico, al menos durante un tiempo en el que pueda estar condicionando la respuesta de las células epiteliales. TGF- $\beta$  podría estar afectando al promotor de miR-127, considerando que se dispara la expresión de miR-127 a medida que avanza el tiempo y el estímulo permanece. En relación con esto, está descrita la elevación de la expresión de ciertos miRNAs mediada por TGF- $\beta$ , sobretodo en el contexto de carcinogénesis y asociado a un peor pronóstico (Lingling G et al., 2016). Entre ellos no está el miR-127 cuya sobreexpresión conferiría a las células un papel beneficioso en la TEM asociada a fibrosis en células renales.

Según se ha detallado en la introducción, en referencia a la TEM que se ha descrito para las células epiteliales tubulares, estos resultados indicarían que las células están transicionando hacia proto-miofibroblastos en presencia del estímulo profibrótico TGF- $\beta$ . Estas células están definidas por la adquisición de características mesenquimales pero no por elevación inminente de  $\alpha$ -SMA, ya que ésta es una característica esencial de los miofibroblastos ya establecidos (Tomasek JJ, 2002).

Una vez que seleccionamos la concentración de 5 ng de TGF- $\beta$  como estímulo profibrótico más adecuado en nuestro modelo celular, realizamos nuevas cinéticas para los genes seleccionados característicos de la TEM que se da en el contexto de fibrosis renal (Landolt L et al., 2017). Y confirmamos: la pérdida de E-Cadherina en las células epiteliales desde los tiempos iniciales de inducción TEM con TGF- $\beta$ , que es el principal indicativo de la iniciación de la transición que están sufriendo estas células; el aumento de la expresión de colágeno y fibronectina; e incluso en el análisis de marcadores estructurales de fibroblastos como  $\alpha$ -SMA y vimentina (Rajić J et al., 2017) se observa una tendencia ascendente, aunque los datos no son tan consistentes en el tiempo como para colágeno y fibronectina. Teniendo en cuenta que las células tubulares proximales están modificándose hacia un epitelio disfuncional, pero que la TEM aún no está establecida, la modulación de miR-127 en estos primeros momentos tendría un efecto positivo para frenar la fibrosis.

Además estudiamos el modelo de Hipoxia/ Reoxigenación In Vitro utilizado en nuestro laboratorio (Conde E et al., 2017), ya que la hipoxia es otro estímulo, también descrito en la bibliografía, que puede producir TGF- $\beta$  y otras moléculas pro-fibroticas e inflamatorias, así como inducir daño crónico a tiempos largos (Wiafe B et al., 2017). En combinación con la hipoxia, se modula, el miR-127 para determinar su papel en otro contexto que puede inducir fibrosis. En este caso nuevamente se observa que las células en las que se sobreexpresa el miR-127 tienen más expresión de E- Cadherina que el resto de condiciones igualmente sometidas a hipoxia, en contraposición al colágeno y la fibronectina que aumentan su expresión con la inhibición del miRNA. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los genes estudiados y las características descritas para la transición que sufren las células tubulares proximales bajo hipoxia (Schnaper HW, 2017), adquiere más consistencia el papel protector de miR-127 en el contexto de la fibrosis renal, y de forma independiente al estímulo fibrótico al que estén sometidos las células epiteliales del riñón.

Con el fin de ver el efecto que tiene la modulación del microRNA 127 por sí sólo en células epiteliales tubulares, sin estar éstas sometidas a otro estímulo, transfectamos las células HK-2



con moléculas mimic, secuencia exógena de miR-127 para sobreexpresión del mismo, y moléculas con la secuencia complementaria del miR-127 que conlleva su disminución. Observamos que en el caso de la E-Cadherina, la expresión disminuye en las células en las que el micro ha sido inhibido incluso a tiempos más cortos, mientras que la expresión de los marcadores mesenquimales ( $\alpha$ -SMA, Colágeno y Fibronectina) está inducida, pero más a largo plazo, en esa misma condición de disminución del miRNA. Por lo tanto, dado que con la modulación de miR-127 por si sola y en presencia de los diferentes estímulos profibróticos usados para este trabajo, los resultados siguen la misma tendencia, proponemos a miR-127 como molécula importante en el mecanismo de TEM, teniendo en cuenta que, en su presencia, las células tienden a preservar sus características epiteliales, mientras que en su ausencia se modifican a favor de otras propias de fenotipo mesenquimal.

Como ya se ha mencionado a lo largo de esta tesis, se han asociado diferentes miRNAs a fibrosis de distintos órganos e incluso se han relacionado con la patología renal, en la que se ha visto que hay aumento de expresión de algunos y disminución de otros. En el primer caso, se correlaciona el aumento con un peor pronóstico de la patología (Gomez IG., et al 2016), en contra de lo que proponemos en este trabajo, donde en base a nuestros resultados, miR-127 podría ser un importante mediador para impedir el avance y establecimiento de la fibrosis y permite proponer su uso como herramienta terapéutica en la ERC, si se demuestra en modelo in vivo su efecto bloqueante o protector.

La presencia del miR-127 en las células epiteliales tubulares proximales, es esencial para el mantenimiento de su fenotipo, según la asociación que se ha publicado entre este miRNA y la TEM (Shi L et al., 2017) y en este caso, a su vez, para el mantenimiento de la funcionalidad del riñón que se pierde cuando las células transicionen y adquieran características mesenquimales. En relación con estos resultados y lo descrito en la bibliografía para la regulación de E-Cadherina en relación con miRNAs y TGF- $\beta$  (Rateitschak K et al., 2016) es concebible que miR-127 estuviera afectando la expresión del gen a través de la modulación de uno de sus represores, Zeb 2, pero resultados no mostrados en esta tesis no prueban que la modulación de la expresión se esté dando a este nivel, en nuestro modelo. De este modo planteamos otras alternativas dentro de las rutas celulares implicadas en TEM que se asocien con los resultados obtenidos, como puede ser la regulación por miR-127, de algún factor intermediario que regule tanto el promotor de la E-Cadherina, como el de otras moléculas asociadas a TEM y estudiadas en esta tesis como la MMP9, según lo descrito en otros estudios (Han S et al., 2013). En relación a estas otras moléculas implicadas en la TEM, nuestros resultados indican que MMP9 no es diana de miR-127 pero sí está modulada en nuestro modelo experimental y posiblemente en relación con la diana

confirmada por primera vez en nuestro trabajo, en este contexto, la MMP13. Además, otros resultados no mostrados, por estar a la espera de confirmación, revelarían Slug como otra diana de actuación para el papel protector de nuestro miRNA en la TEM.

Además de la expresión de los genes asociados a TEM mediante RT-qPCR e inmunofluorescencias, que ponen de manifiesto el cambio fenotípico hacia fibroblastos, estudiamos mediante ensayos de cierre de herida, otra de las características asociada a este mecanismo, la capacidad migratoria que adquieren las células epiteliales. Observamos en las imágenes de estos experimentos, que cuando las células epiteliales tubulares proximales se transfectan con la molécula mimic de miR-127, sobreexpresando el miR-127, las células no tienen la capacidad de migrar y cerrar la herida, mientras que con la transfección del inhibidor del micro migran e intentan reconstituir la monocapa de nuevo. Ocurre lo mismo en presencia de TGF- $\beta$  como promotor de fibrosis, de manera que podemos concluir que la presencia del miR-127 evita que las células epiteliales adquieran características mesenquimales como la capacidad migratoria y no contribuyan a la fibrosis del tejido renal. En la bibliografía se ha asociado a miR-127 con el proceso de migración en las células tumorales, donde se propone que actuando sobre ciertos factores de transcripción como FMNL3, que afecta directamente a la polimerización de la actina o a proteínas anti-apoptóticas como BAG5, puede regular la migración celular (Gao X et al., 2016; Yu Y et al., 2016; Jiang H et al., 2014). En relación a la migración en esta tesis hemos demostrado que miR-127 tiene como diana MMP13, cuya relación con la migración, se ha descrito en células tumorales (Yang Z et al., 2013). Además, se estudió en esta misma aproximación experimental, la expresión de TGF- $\beta$  por parte de las células epiteliales y se observó que se comporta como los genes detallados anteriormente asociados al fenotipo mesenquimal. Las células en las que se ha inhibido el miRNA-127 expresan más cantidad de este factor de crecimiento, tanto en los cultivos en los que se ha suplementado con la molécula exógena como en los que sólo están transfectados, confirmando que las células en presencia del miRNA evitan un contexto de fibrosis, que por el contrario está favorecido en ausencia de éste. Mir-127 a través de sus diferentes dianas, podría controlar la expresión de TGF- $\beta$  como se ha descrito para células tumorales en las que al inhibir represores del gen, se induce la expresión del mismo (Jiang H et al., 2014) o también podría hacerlo mediante feedback negativos implicando a otras moléculas destacadas en este contexto como las metaloproteinasas y en concreto la MMP13, que como diana predicha de miR-127 ha sido también validada en células de carcinoma hepatocelular (Yang Z et al., 2013).

En la enfermedad renal crónica se ha descrito la importancia de diferentes tipos celulares partícipes en la progresión y el establecimiento de la fibrosis (Vega G et al., 2016) de manera

que para el estudio de la misma no podemos tener sólo en cuenta la alteración de las células epiteliales de forma aislada, sino la implicación que la disfunción del epitelio puede tener sobre el resto de células que constituyen el microambiente fibrótico, en el que se incluyen fibroblastos residentes y células del sistema inmune (Ma PF et al., 2017).

En relación con esto, estudiamos el papel de miR-127 sobre fibroblastos renales, modulando directamente este miRNA en los fibroblastos o mediante medios condicionados procedentes de células HK-2, en las que se ha modulado miR-127. Para ello realizamos diferentes análisis en los sobrenadantes de los cultivos de las diferentes condiciones de transfección de las HK-2, para estudiar el patrón de secreción de miRNAs y determinadas citoquinas, asociado a la modulación de miR-127 en células epiteliales y su destacado papel en señalización intercelular, teniendo en cuenta la relación que ha sido publicada recientemente entre estas moléculas y la TEM en cáncer (Dalla Poza E et al., 2017). En este trabajo describimos dos patrones de expresión distintos, en los sobrenadantes de células en las que miR-127 está siendo sobreexpresado, con menor expresión de: VEGF, IL-13, IL8 (CXCL8), MMP-9, IL-6 y GRO (CXCL1) y mayor expresión de: GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-5, IFN $\gamma$ , IL-2, y TNF- $\alpha$  y viceversa, cuando miR-127 está inhibido, aumentan: VEGF, IL-13, IL8 (CXCL8), MMP-9, IL-6 y GRO (CXCL1) y hay menor detección de: GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-5, IFN $\gamma$ , IL-2, y TNF- $\alpha$ . Estos resultados son de una única aproximación y dos diluciones de muestra, en la que además, algunas de las citoquinas disponibles en el Array no resultaron valorables en nuestro contexto experimental. Además en un ELISA específico para TGF- $\beta$  observamos que a 72 horas las células en las que miR-127 está sobreexpresado secretan más TGF- $\beta$  al medio, con respecto a las que han sido transfectadas con el inhibidor del miRNA, viéndose este efecto revertido cuando se mantiene el cultivo hasta las 120 horas. En este caso se detecta más TGF- $\beta$  en los sobrenadantes de las HK-2 cuyo miR-127 ha sido inhibido. Este miRNA podría estar implicado en la ruta de señalización del TGF- $\beta$ , como otros miRNAs que han sido descritos, afectando a diferentes niveles de la misma e incluso tanto de la ruta canónica como no canónica (Génesis V et al., 2016). En este sentido, se ha publicado para el *cluster* miR-106b, miR-93 y miR-25 en cáncer de mama que aumenta la expresión del receptor I de TGF- $\beta$  e inhibe Smad 7 (Smith AL et al., 2012). Esto está en relación con la idea del papel protector de miR-127 en el contexto de fibrosis renal y ERC, de manera que en los primeros momentos se genera una señal de fibrosis con moléculas mediadoras como TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$ , para la reparación del tejido dañado como sucede en el caso de reparación de una herida (Rahayu P et al., 2017; Hirschberg R, 2005), pero mantiene posteriormente a las células epiteliales protegidas de la excesiva señalización, que las haría transicionar de su fenotipo epitelial a otro mesenquimal, con la consiguiente disfunción de los túbulos que, en último término, llevaría a la pérdida de funcionalidad del riñón. Además

de determinar la expresión de citoquinas, analizamos por RT- qPCR, la expresión de miRNAs en sobrenadantes de células epiteliales, para los cuales también se observan patrones de expresión distintos, en relación con la diferente funcionalidad que desempeña cada uno en el contexto renal, coincidiendo con lo descrito también en otros trabajos. Es el caso de miR-126 asociado a la disfunción del endotelio o el miR-21 a miofibroblastos (Metzinger-Le Meuth V et al., 2016).

En nuestro trabajo, observamos diferencias entre el efecto provocado por el sobrenadante de las células epiteliales que no habían sido sometidas al estímulo profibrótico de TGF-  $\beta$ , con respecto a las que sí habían sido tratadas. En caso de no estar presente dicho estímulo, el cultivo de los fibroblastos mantiene más su integridad que si las HK-2 habían sido cultivadas y tratadas con TGF- $\beta$ , incluso la transfección de las células epiteliales tiene efecto sobre los fibroblastos del entorno, haciendo que se pierda la integridad de la monocapa en los casos en los que se había sobreexpresado el miRNA, de manera más acentuada cuando la sobreexpresión se daba en el modelo de fibrosis. Por el contrario, el cultivo de fibroblastos, tiene menos afectación con los sobrenadantes de las HK-2 en las que se ha inhibido el miR-127, coincidiendo con la menor presencia de ciertas citoquinas señalizadoras de muerte celular como TNF- $\alpha$ , en estos sobrenadantes. Este TNF- $\alpha$ , además, puede estar estimulando a los fibroblastos para la secreción paracrina de este factor que potencia aún más la fibrosis del órgano, como se ha descrito que sucede en la fibrosis pulmonar (Epstein Shochet G et al., 2017). Destacamos también otra de las moléculas tradicionalmente asociada al contexto de inflamación y fibrosis como es el IFN- $\gamma$ , que también está aumentado en los sobrenadantes que han inducido más toxicidad al cultivo de fibroblastos y que como se ha descrito en la bibliografía en otros contextos (Sonar SA et al., 2017), puede estar afectando proteínas de membrana implicadas en adhesión, con la consecuente afectación del mantenimiento de la monocapa del cultivo.

Así, estos datos correlacionan de nuevo con la hipótesis de que miR-127 tenga un efecto protector de la fibrosis, no sólo en relación con el mecanismo de TEM de las células epiteliales, sino por las señales que se liberan al medio y pueden afectar al resto de tipos celulares presentes en el tejido renal.

La importancia de considerar y estudiar de manera conjunta el microambiente fibrótico se hace patente en nuestro trabajo al comprobar que la modulación de miR- 127 directa en los fibroblastos no tiene efecto, sino mediante la señalización intercelular desencadenada, en este caso, por la modulación de miR-127 en las células epiteliales y su secretoma. De hecho la presencia del miR-127 residual en los sobrenadantes no parece relevante en la respuesta de los fibroblastos ya que nuestros datos indican ausencia de pinocitosis, para la posible captación del miR-127 del medio, por ellos. Nuestros experimentos demuestran que factores secretados por

células epiteliales al medio, está estimulando la expresión de miR-127 en las NRK-49F, dando como resultado la pérdida de integridad de la monocapa del cultivo, como ya se ha detallado previamente en esta discusión.

Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en NRK-49F bajo el tratamiento con TGF- $\beta$ , en el que el miRNA tiende a disminuir su expresión en presencia del estímulo profibrótico, así como a aumentar marcadores de miofibroblastos. Estos resultados coinciden con el papel descrito en la bibliografía para TGF- $\beta$  en fibroblastos, en la fibrogénesis renal intersticial donde participan citoquinas como la IL-1 $\beta$  y FGF2 (Hirschberg R, 2005). En nuestros experimentos hemos demostrado que estas moléculas e incluso la expresión de TGF- $\beta$ , tiende a incrementarse en los cultivos condicionados con medio de células en las que se ha inhibido miR-127. Así, podemos describir la importancia de la disminución de miR-127 en el mantenimiento de los fibroblastos y la progresión de la fibrosis, en sinergia con lo que sucede en las células tubulares, en las que una menor expresión del miRNA las conduce a un fenotipo disfuncional. Además hemos determinado la contribución de los fibroblastos a la fibrosis del parénquima renal, a nivel estructural con el depósito de colágeno y fibronectina, coincidiendo el aumento de la expresión de estos genes con el aumento de expresión de  $\alpha$ -SMA. Este efecto es más evidente a mayor concentración de TGF- $\beta$  y mayor tiempo de estímulo, de manera que los fibroblastos residentes en el parénquima renal adquieren características de miofibroblastos por disminución de miR-127.

Recientemente se han asociado diferentes miRNAs como miR-141-3p, miR-29a o miR-126 con la migración, proliferación y liberación de citoquinas en fibroblastos, en diferentes contextos fisiopatológicos (Wu Y et al., 2017; Feng J et al., 2017; Ko JY et al., 2017) así como otros miRNAs con el mantenimiento de fibroblastos renales (Xie F et al., 2015). Otros estudios han identificado miRNAs relacionados con la producción y remodelación de matriz extracelular como miR-192 y miR-200b/c, que aumentan la expresión de COL1A2 y COL4A1 y miR-29, que ejerce una acción antifibrótica, a través de la represión de la expresión de varios tipos de colágeno (Trionfini P, 2015).

Además, se ha demostrado que miR-127, entre otros, es indicador de la supervivencia libre de recaída en pacientes con carcinoma renal no metastático (Ondrej Slaby et al., 2012). Está publicado que miR-127 promueve senescencia en fibroblastos humanos (WI-38 y IMR-90) y reduce la proliferación de fibroblastos asociados a cáncer de mama (Chen J et al., 2013). Pero hasta el momento, no existen datos publicados sobre la expresión, regulación y función de miR-127 en fibroblastos renales ni en el microambiente de la ERC.

Por primera vez, con este trabajo, se describe el papel protector de miR-127 en la fibrosis renal, no sólo en relación con el mecanismo de TEM de las células epiteliales tubulares sino de forma paracrina, por las señales que se liberan al medio y afectan el resto de tipos celulares presentes en riñón pudiendo estar “orquestando” el establecimiento de la fibrosis del tejido renal.

Con el fin de profundizar en la caracterización del modelo de fibrosis establecido In Vitro y en relación al miR-127, estudiamos las metaloproteinasas, como proteínas encargadas del remodelado de la matriz extracelular (Verma RP, 2007; Luo D, 2017). En concreto la MMP 9 es una gelatinasa que se ha visto expresada en células epiteliales y la MMP 13 una colagenasa. Las proponemos como mediadoras en la fibrosis del parénquima renal, tras observar, mediante inmunohistoquímica, que hay más expresión de MMP 9 en las células epiteliales de los túbulos inmersos en tejido fibrotizado con respecto a aquellos en los que el parénquima renal no tiene modificación o que por el contrario está totalmente desestructurado. Valorando la secreción y actividad de las mismas en nuestro modelo celular, observamos que la transfección de miR-127 por sí solo, no es suficiente para que haya una secreción de MMP 9 y MMP 13 por parte de la célula al medio, detectable mediante el anticuerpo específico. Sin embargo, cuando existe un estímulo profibrótico la cantidad que se libera desde las células sí es detectable, probablemente con el fin de mediar en este proceso. La sobreexpresión del miR-127, disminuye la expresión de las dos MMPs estudiadas, con respecto a su control y por el contrario, en la inhibición con el Anti- miR-127, se da cierto aumento. En cuanto a la actividad, observamos que sin tratamiento hay menos actividad y bajo tratamiento con TGF-  $\beta$  la transfección con Pre-127 disminuye la actividad metaloproteínasa con respecto a la de su control y con la inhibición del miRNA se ve aumentada. Esto confirma la implicación de la MMP9 y MMP13 en la TEM en células HK-2 según se ha descrito en otros estudios para otras células (Sakamaki Y et al., 2010) e indica que miR-127 estaría mediando expresión y actividad de las MMPs. Todos estos resultados demuestran que la modulación de miR-127 sería una potencial aproximación terapéutica, no descrita hasta este momento, para evitar el establecimiento de la fibrosis renal subyacente al daño renal crónico.

Por ello y dado que uno de los objetivos de nuestra investigación, es proponer la intervención sobre miR-127 como una nueva estrategia terapéutica en daño renal crónico, además del estudio In Vitro, analizamos muestras del modelo in vivo de OUU, que en ratones mimetiza la ERC y biopsias y sueros de pacientes con ERC.

Observamos mayor desestructuración del parénquima renal coincidiendo con mayor acúmulo de colágeno e infiltrado inflamatorio en las muestras a 5 días de la intervención de OUU, con respecto a su contralateral, y aún más en comparación al Sham lo que da validez al modelo como

aproximación experimental a la fibrosis y por tanto ERC in vivo (Eddy AA, 2012),. Además, en este trabajo se ha demostrado que los miRNAs de la combinación validada y patentada por estudios previos de nuestro laboratorio se detectan en extractos totales de RNA de riñón de 5 días de OUU, y que el patrón de expresión de miR-127 es diferente al del resto de los miRNAs, pues sus valores de expresión son mayores en el riñón dañado con respecto al contralateral, estimado por qRT-PCR. Además, se comprueba por hibridación In Situ la expresión y localización en túbulos proximales, de este miRNA en cortes parafinados de ambos riñones: a 5 y 15 días se correlaciona la mayor expresión de miR-127 en el riñón en el que se ha realizado la obstrucción con respecto a su contralateral. En relación a esto, un estudio reciente ha descrito la presencia y el papel protector de un miRNA, el miR-378, en el daño renal generado en el modelo OUU, aunque en este caso se observa menor expresión en el riñón fibrotizado que en el contralateral, en correlación al aumento de MAPK1 que es la molécula identificada como diana para este miRNA (Wang B et al., 2017). En nuestro modelo, la mayor expresión del miR-127 en presencia de fibrosis estaría evitando el establecimiento total de la misma, considerando que en este caso la molécula diana es una metaloproteinasa (MMP13 directa y quizá MMP9 indirecta) cuya menor expresión resulta positiva para evitar la progresión de la fibrosis y teniendo en cuenta además, la implicación descrita para miR-127 en la señalización intercelular del microambiente fibrótico.

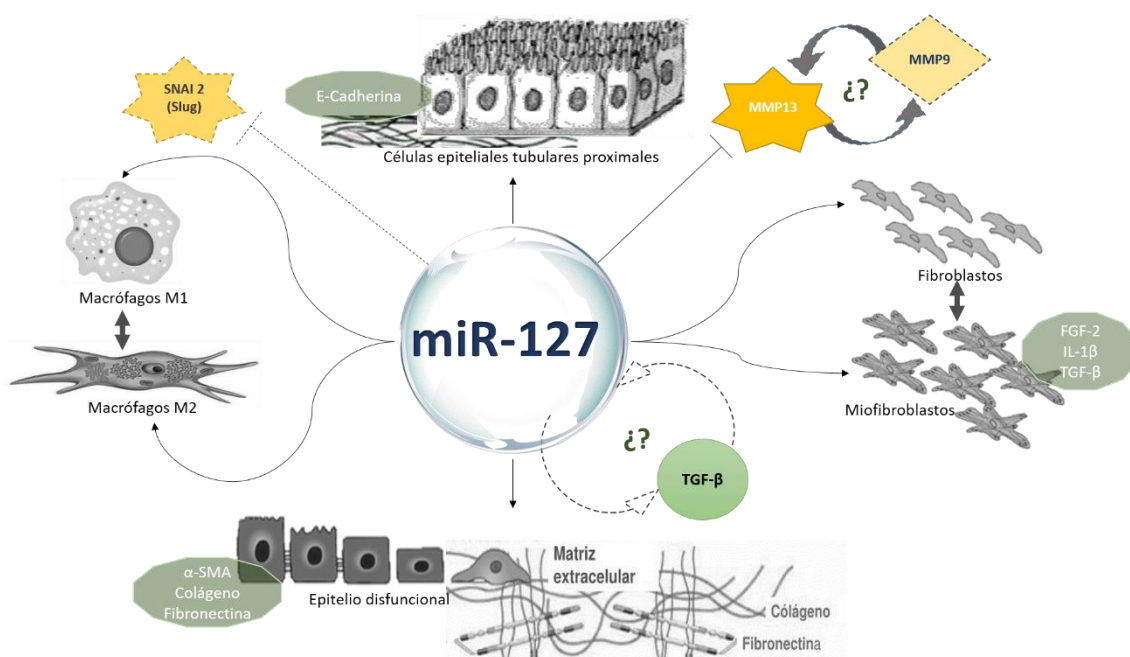
Por otro lado, las biopsias de los pacientes de ERC se valoran conforme a la clasificación Banff (Solez K et al., 2008) y el miR-127-3p correlaciona con el grado asignado a la biopsia según dicha clasificación, detectándose más expresión en un daño más severo. Además, como se ha detallado previamente para el modelo animal, la hibridación in situ de miR-127 en biopsias humanas confirma la presencia y localización del miRNA en los túbulos proximales, mayor en pacientes diagnosticados de grado III y II que en lo de grado I, con lo que, podría ser marcador de severidad. Este nuevo marcador de severidad estructural podría aportar información adicional a la que aporta el filtrado glomerular, en el seguimiento del paciente.

Finalmente, teniendo en cuenta la característica de los miRNAs de ser secretados al medio extracelular y estar presente en fluidos corporales (Cortez M et al., 2009), analizamos los niveles de los miRNAs de la combinación asociada a daño renal, identificada en nuestro laboratorio (Aguado- Fraile E et al., 2015), en suero de pacientes con diferentes grados de ERC. Observamos que, efectivamente miR-127 está presente y va dejando de ser detectado en suero en estadios finales de ERC (estadio III avanzado, estadio IV y estadio V) en los que la fibrosis ya está totalmente establecida. Por ello, la determinación de miR-127 en suero, además de en biopsia, podría añadir valor al seguimiento de la evolución de la enfermedad en estos pacientes.

Por otro lado, hemos correlacionado la expresión de los miRNAs, con datos clínicos de pacientes como: etiología, hábito de tabaco y otras patologías asociadas a la ERC como diabetes, dislipemias e hipertensión arterial, para una mejor estratificación e incluso manejo de los mismos, acorde con otras comorbilidades. Observamos diferencias entre los pacientes y entre los propios miRNAs, teniendo en cuenta además que algunos miRNAs como miR-10a y miR-27a no son detectados en el suero de estos pacientes, indicando que el patrón de miRNAs asociado a FRA varía en los pacientes con ERC tal y como cabría esperar, demostrando su especificidad. En los análisis estadísticos, miR-146 resultó significativo entre pacientes con y sin dislipemias pudiendo estar en relación con otros estudios de la bibliografía que lo asocian con el factor de crecimiento del endotelio vascular e inflamación (Seo HH et al., 2017; Zheng CZ et al., 2017). El miR-26b y miR-126 mostraban correlación con pacientes con nefropatía diabética, habiendo sido este último recientemente asociado a periodontitis en personas con diabetes (Wu Y et al., 2017). Considerando la importancia de las comorbilidades en los pacientes con ERC, el hecho de que miRNAs de nuestra combinación resulten ser significativos para pacientes con ERC, dislipemias y diabetes puede tener relevancia para la clínica, puesto que los constituiría como una nueva herramienta, no descrita hasta el momento, para diagnóstico temprano de la ERC que se desencadena asociada a estas patologías. Así se podría hacer un seguimiento más exhaustivo de estos pacientes y poder actuar terapéuticamente en estadios más tempranos de la enfermedad renal crónica o incluso impedir que ésta se desarrollara, si llegasen a establecerse como dianas terapéuticas en esos contextos.

En resumen y como se representa en la figura 29, en este trabajo se ha caracterizado el papel de miR-127-3p en el microambiente fibrótico subyacente a la ERC. miR-127 tiene un papel relevante en las células epiteliales tubulares proximales, que pueden contribuir a la fibrosis por TEM, así como en los fibroblastos del parénquima renal, fundamentales en la progresión y el mantenimiento de esta fibrosis. Nuestros resultados sugerirían que miR-127 es un mediador clave en el daño renal crónico, con un papel protector frente a la TEM en células tubulares y un papel regulador de las alteraciones del microambiente, regulando la proliferación y activación de los fibroblastos intersticiales y según otros resultados preliminares del laboratorio, sobre la polarización de macrófagos residentes.





**Fig 29: miR-127 está orquestando la fibrosis renal, regulando el microambiente fibrótico.**

Hasta nuestro conocimiento, en la base de datos de análisis clínicos (*clinicaltrials.gov*), no está anotado ningún ensayo clínico utilizando miRNAs como opción terapéutica en ERC. Si bien se propone su uso como biomarcador de respuesta a tratamientos experimentales en ERC.

Nuestros resultados obtenidos en el modelo animal de OUU, biopsias y suero de pacientes de ERC, permiten proponer dicho microRNA como biomarcador temprano de desarrollo de daño renal crónico, marcador de severidad del mismo y posible diana terapéutica, ya que mediante su modulación se podría frenar el establecimiento de la fibrosis del órgano en base a nuestros resultados in vivo. Por todo ello, en nuestro laboratorio, en este momento se está trabajando en la prueba de concepto: modular miR-127 en el modelo de OUU y demostrar que la sobreexpresión de miR-127 puede bloquear el desarrollo de la fibrosis renal.

## Conclusiones

1. La sobreexpresión de miR-127-3p mantiene el fenotipo epitelial de células proximales tubulares y bloquea el proceso de TEM en presencia de un estímulo profibrótico, TGF- $\beta$  o hipoxia/ reoxigenación, reduciendo la expresión de marcadores de TEM, la secreción de matriz extracelular y la capacidad migratoria celular.
2. Hemos validado MMP13 como diana de miR-127-3p en el contexto de fibrosis renal inducida por TGF- $\beta$ .
3. miR-127-3p modulado en células epiteliales afecta a los fibroblastos del entorno, mediante inducción de toxicidad y reduciendo activación.
4. miR-127-3p está sobreexpresado en el riñón sometido a OUU en ratones, respecto a su contralateral, indicando que miR-127 se asocia a daño renal crónico in vivo.
5. En biopsias de pacientes con ERC, la detección de miR-127 correlaciona con el grado histopatológico establecido por la clasificación Banff, confirmándose su asociación con el daño renal crónico.
6. En sueros de pacientes con ERC se detectan y modulan sus niveles los miRNAs: miR-127-3p, miR101, miR-210, miR-126, miR-26b, miR-29a, miR-146a y miR-93-3p, indicando su posible utilidad como biomarcadores pronóstico de evolución de pacientes con FRA hacia enfermedad renal crónica (ERC).
7. Los niveles de expresión en suero de miR-26b y miR-126 se asocian con nefropatía diabética y los de miR-146 presentan diferencias significativas entre pacientes que tienen o no dislipemias, con áreas bajo la curva relevantes para su utilidad diagnóstica.

## Bibliografía

**Aguado-Fraile E, Ramos E, Conde E, Rodríguez M, Liaño F, García-Bermejo ML.** (2013). MicroRNAs in the kidney: novel biomarkers of acute kidney injury. *Nefrología*. 33 (6):826-34.

**Aguado-Fraile E, Ramos E, Conde E, Rodríguez M, Martín-Gómez L, Lieten A, Candela Á, Ponte B, Liaño F, García-Bermejo ML.** (2015). A Pilot Study Identifying a Set of microRNAs As Precise Diagnostic Biomarkers of Acute Kidney Injury. *PLoS One*. 10(6):e0127175.

**Aguado-Fraile E, Ramos E, Sáenz-Morales D, Conde E, Blanco-Sánchez I, Stamatakis K, del Peso L, Cuppen E, Brüne B, Bermejo ML.** (2012). miR-127 protects proximal tubule cells against ischemia/reperfusion: identification of kinesin family member 3B as miR-127 target. *PLoS One*. 7 (9):e44305.4.

**AIDS Working Group (GESIDA) of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC); Spanish Society of Nephrology (S.E.N.); Spanish Society of Clinical Chemistry and Molecular Pathology (SEQC), Górriz JL, Gutiérrez F, Trullas JC, Arazo P, Arribas JR, Barril G, Cervero M, Cofan F, Domingo P, Estrada V, Fulladosa X, Galindo MJ, Gracia S, Iribarren JA, Knobel H, López-Aldeguer J, Lozano F, Martínez-Castelao A, Martínez E, Mazuecos MA, Miralles C, Montañés R, Negredo E, Palacios R, Pérez-Elías MJ, Portilla J, Praga M, Quereda C, Rivero A, Santamaría JM, Sanz J, Sanz J, Miró JM.** (2014). Consensus document on the evaluation and management of renal disease in HIV-infected patients. *Nefrología (Madr.)* 34 (2): 1-81.

**Allouch S, Munusamy S** (2017). AMP-activated Protein Kinase as a Drug Target in Chronic Kidney Disease. *Curr Drug Targets*. [Epub ahead of print]

**Bartel DP.** (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.

**Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A.** (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2 (2):84-9.

**Bellinger MA, Bean JS, Rader MA, Heinz-Taheny KM, Nunes JS, Haas JV, Michael LF, Rekhter MD.** (2014). Concordant changes of plasma and kidney microRNA in the early stages of acute kidney injury: time course in a mouse model of bilateral renal ischemia-reperfusion. *PLoS One*. 9(4):e93297.

**Bernardo BC, Ooi JY, Lin RC, McMullen JR.** (2015). miRNA therapeutics: a new class of drugs with potential therapeutic applications in the heart. *Future Med Chem*. 7(13):1771-92.

- Bhaskaran M, Wang Y, Zhang H, Weng T, Baviskar P, Guo Y, Gou D, Liu L** (2009) MicroRNA-127 modulates fetal lung development. *Physiol Genomics*. 37:268–278.
- Bhowmik DM, Dinda AK, Mahanta P, Agarwal SK.** (2010). The evolution of the Banff classification schema for diagnosing renal allograft rejection and its implications for clinicians. *Indian J Nephrol*. 20(1): 2–8.
- Biasiolo M, Sales G, Lionetti M, Agnelli L, Todoerti K, Bisognin A, Coppe A, Romualdi C, Neri A, Bortoluzzi S.** (2011). Impact of host genes and strand selection on miRNA and miRNA\* expression. *PLoS One*. 6 (8):e23854.
- Calvopina DA, Coleman MA, Lewindon PJ, Ramm GA.** (2016). Function and Regulation of MicroRNAs and Their Potential as Biomarkers in Paediatric Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 17(11).
- Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA.** (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*. 2 (2):76-83.
- Charbonney E, Speight P, Masszi A, Nakano H, Kapus A.** (2011).  $\beta$ -catenin and Smad3 regulate the activity and stability of myocardin-related transcription factor during epithelial-myofibroblast transition. *Mol Biol Cell*. 22: 4472–4485.
- Chen IC, Chiang WF, Huang HH, Chen PF, Shen YY, Chiang HC.** (2014). Role of SIRT1 in regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma metastasis. *Molecular Cancer*. 13:254.
- Chen J, Wang M, Guo M, Xie Y, Cong YS.** (2013). miR-127 Regulates Cell Proliferation and Senescence by Targeting BCL6. *PLoS One*. 8(11): e80266.
- Chen JS, Huang JQ, Dong SH, Huang XH.** (2016). Effects of microRNA-379 5p on proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cell line. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 96 (18):1450-3.
- Chen W, Zhou S, Mao L, Zhang H, Sun D, Zhang J, Li J, Tang JH** (2016). Crosstalk between TGF- $\beta$  signaling and miRNAs in breast cancer metastasis. *Tumour Biol*. 37 (8):10011-9.
- Conde E, Giménez-Moyano S, Martín-Gómez L, Rodríguez M, Ramos ME, Aguado-Fraile E, Blanco-Sanchez I, Saiz A, García-Bermejo ML.** (2017). HIF-1 $\alpha$  induction during reperfusion avoids maladaptive repair after renal ischemia/reperfusion involving miR127-3p. *Sci Rep*. 7:41099.

- Cortez M, Calin G.** (2009). MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 9: 703–711.
- Cushing L, Kuang PP, Qian J, Shao F, Wu J, Little F, Thannickal VJ, Cardoso WV, Lu J** (2011) MIR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 45(2):287- 94.
- Dalla Pozza E, Forciniti S, Palmieri M, Dando I.** (2017). Secreted molecules inducing epithelial-to-mesenchymal transition in cancer development. *Semin Cell Dev Biol.* [Epub ahead of print]
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A.** (2001) TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 29(2):117-29.
- Eddy AA, López-Guisa JM, Okamura DM, Yamaguchi I** (2012). Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. *Pediatr Nephrol.* 27(8):1233-47.
- Eger A, Mikulits W.** (2005). Models of epithelial-mesenchymal transition. *Drug Discovery Today: Disease Models.* 2:57–63.
- Epstein Shochet G, Brook E, Israeli-Shani L, Edelstein E, Shitrit D.** (2017). Fibroblast paracrine TNF- $\alpha$  signaling elevates integrin A5 expression in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *Respir Res.* 18(1):122.
- Feng J, Xue S, Pang Q, Rang Z, Cui F.** (2017) miR-141-3p inhibits fibroblast proliferation and migration by targeting GAB1 in keloids. *Biochem Biophys Res Commun.* [Epub ahead of print]
- Février B, Raposo G.** (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol.* 16 (4):415-21.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP** (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105.
- Gao X, Wang X, Cai K, Wang W, Ju Q, Yang X, Wang H, Wu H.** (2016). MicroRNA-127 is a tumor suppressor in human esophageal squamous cell carcinoma through the regulation of oncogene FMNL3. *Eur J Pharmacol.* 791:603-610.
- García-López J, Briño-Enríquez Miguel A., del Mazo Jesús.** (2013). MicroRNA biogenesis and variability. *BioMol Concepts.* 4(4): 367–380.
- Garcia-Lopez J, del Mazo J.** (2012). Expression dynamics of microRNA biogenesis during preimplantation mouse development. *Biochim Biophys Acta;* 1819: 847 – 54.

- Garcia-Lopez J, Hourcade JD, del Mazo J.** (2013). Reprogramming of microRNAs by adenosine-to-inosine editing and the selective elimination of edited microRNA precursors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Nucleic Acids Res.* 41: 5483 – 93.
- Glowacki F, Savary G, Gnemmi V, Buob D, Van der Hauwaert C, Lo-Guidice JM, Bouyé S, Hazzan M, Pottier N, Perrais M, Aubert S, Cauffiez C.** (2013). Increased circulating miR-21 levels are associated with kidney fibrosis, *PLoS One* 8(2):e58014.
- Gomez IG, Nakagawa N, Duffield JS** (2016). MicroRNAs as novel therapeutic targets to treat kidney injury and fibrosis. *American Journal of Physiology - Renal Physiology.* 310(10), F931–F944.
- Gonzalez DM, Medici D.** (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal.* 7(344):re8.
- Gorostidi M, Santamaría R, Alcázar R, Fernández-Fresnedo G, Galcerán JM, Goicoechea M, Oliveras A, Portolés J, Rubio E, Segura J, Aranda P, De Francisco ÁLM, Del Pino MD, Fernández-Vega F, Górriz JL, Luño J, Marín R, Martínez I, Martínez-Castelao A, Orte LM, Quereda C, Rodríguez-Pérez JC, Rodríguez M, Ruilope LM** (2014). Documento de la Sociedad Española de Nefrología sobre las guías KDIGO para la evaluación y el tratamiento de la enfermedad renal crónica. *Nefrologia (Madr.)* 34:302-16.
- Ha M, Kim VN.** (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15: 509-524.
- Han S, Han L, Sun H, Zan X, Zhou Z, Xu K, Yao Y, Liu Q.** (2013). Krüppel-like factor expression and correlation with FAK, MMP-9 and E-cadherin expression in hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep.* 8(1):81-8.
- Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J.** (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature.* 495: 384 – 8.
- Hirschberg R.** (2005). Wound healing in the kidney: complex interactions in renal interstitial fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol.* 16(1):9-11.
- Hu J, Zhai C, Hu J, Li Z, Fei H, Wang Z, Fan W.** (2017) MiR-23a inhibited IL-17-mediated proinflammatory mediators expression via targeting IKK $\alpha$  in articular chondrocytes. *Int Immunopharmacol.* 43: 1-6.
- Huang SH, Law CH, Kuo PH, Hu RY, Yang CC, Chung TW, Li JM, Lin LH, Liu YC, Liao EC, Tsai YT, Wei YS, Lin CC, Chang CW, Chou HC, Wang WC, Chang MD, Wang LH, Kung HJ, Chan HL, Lyu PC.** (2016). MMP-13 is involved in oral cancer cell metastasis. *Oncotarget.* 7(13):17144-61.



- Huang X, Teng Y, Yang H, Ma J.** (2016). Propofol inhibits invasion and growth of ovarian cancer cells via regulating miR-9/NF- $\kappa$ B signal. *Braz J Med Biol Res.* 49 (12):e5717.
- Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS.** (2010). Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol.* 176 (1):85-97.
- Humphreys BD.** (2012). Targeting pericyte differentiation as a strategy to modulate kidney fibrosis in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol.* 32(5): 463–470.
- Huntzinger E, Izaurralde E.** (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Rev. Genet.* 12, 99–110.
- Hwang SY, Deng X, Byun S, Lee C, Lee SJ, Suh H, Zhang J, Kang Q, Zhang T, Westover KD, Mandinova A, Lee SW.** (2016). Direct targeting of  $\beta$ -catenin by a small molecule stimulates proteasomal degradation and suppresses oncogenic Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Cell Rep.* 16(1): 28–36.
- Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG.** (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest.* 110(3):341-50.
- James MT, Hemmelgarn BR, Tonelli M.** (2010) Early recognition and prevention of chronic kidney disease. *Lancet.* 375(9722):1296-309
- Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patick AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kauppinen S, Levin AA, Hodges MR.** (2013). Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* 368(18):1685-94.
- Jiang H, Hua D, Zhang J, Lan Q, Huang Q, Yoon JG, Han X, Li L, Foltz G, Zheng S, Lin B** (2014). MicroRNA-127-3p promotes glioblastoma cell migration and invasion by targeting the tumor-suppressor gene SEPT7. *Oncol Rep.* 31(5):2261-9.
- Jiang H, Jin C, Liu J, Hua D, Zhou F, Lou X, Zhao N, Lan Q, Huang Q, Yoon JG, Zheng S, Lin B.** (2014). Next generation sequencing analysis of miRNAs: MiR-127-3p inhibits glioblastoma proliferation and activates TGF- $\beta$  signaling by targeting SKI. *OMICS.* 18 (3):196-206.
- Jiang L, Qiu W, Zhou Y, Wen P, Fang L, Cao H, Zen K, He W, Zhang C, Dai C, Yang J.** (2013). A microRNA-30e/mitochondrial uncoupling protein 2 axis mediates TGF- $\beta$ 1- induced tubular epithelial cell extracellular matrix production and kidney fibrosis. *Kidney Int.* 84(2): 285–296.

- Jiménez Tortosa MR, Martínez Martínez E** (2015). Utilización en la actualidad de los biomarcadores en el daño renal agudo: Resumen de las Recomendaciones de la 10ª ADQI (Acute Dialysis Quality Initiative). *Rev electron AnestesiaR* ; Vol 7 (8): 361
- Kalluri R, Weinberg RA.** (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 119 (6):1420-8.
- Kang Y, Massagué J.** (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell.* 118 (3):277-9.
- Kang Ae L, Celeste MN.** (2012). New Insights into the Regulation of Epithelial–Mesenchymal Transition and Tissue Fibrosis. *Int Rev Cell Mol Biol.* 294: 171-221.
- Kato M, Zhang J, Wang M, Lanting L, Yuan H, Rossi JJ, Natarajan R.** (2007). MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF- $\beta$ -induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 104, 3432–3437.
- Ko JY, Lee MS, Lian WS, Weng WT, Sun YC, Chen YS, Wang FS.** (2017) MicroRNA-29a Counteracts Synovitis in Knee Osteoarthritis Pathogenesis by Targeting VEGF. *Sci Rep.* 7(1):3584.
- Kopan R.** (2002). Notch: a membrane-bound transcription factor. *J Cell Sci.* 115(Pt 6):1095-7.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W.** (2010).The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics* 11: 597–610.
- Lan HY** (2012). Transforming growth factor- $\beta$ /Smad signalling in diabetic nephropathy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 39 (8): 731–738.
- Landolt L, Eikrem Ø, Strauss P, Scherer A, Lovett DH, Beisland C, Finne K, Osman T, Ibrahim MM, Gausdal G, Ahmed L, Lorens JB, Thiery JP, Tan TZ, Sekulic M, Marti HP.** (2017). Clear Cell Renal Cell Carcinoma is linked to Epithelial-to-Mesenchymal Transition and to Fibrosis. *Physiol Rep.* 5(11). pii: e13305.
- Lee CG, Kim JG, Kim HJ, Kwon HK, Cho IJ, Choi DW, Lee WH, Kim WD, Hwang SJ, Choi S, Kim SG.** (2014). Discovery of an integrative network of microRNAs and transcriptomics changes for acute kidney injury. *Kidney Int.* 86 (5):943-53.
- Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D** (1999) A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med.* 130:461-70.

**Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J; CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration).** (2009) A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 150:604-12.

**Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, De Zeeuw D, Hostetter TH, Lameire N, Eknoyan G.** (2005). Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney International.* 67(6): 2089–2100.

**Li R, Chung AC, Dong Y, Yang W, Zhong X, Lan HY.** (2013). The microRNA miR-433 promotes renal fibrosis by amplifying the TGF- $\beta$ /Smad3- Azin1 pathway. *Kidney Int.* 84: 1129–1144.

**Li X, Deng W, Nail CD, Bailey SK, Kraus MH, Ruppert JM, Lobo-Ruppert SM.** (2006). Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene.* 25:609–621.

**Lim AK, Ma FY, Nikolic-Paterson DJ, Kitching AR, Thomas MC, Tesch GH.** (2010). Lymphocytes promote albuminuria, but not renal dysfunction or histological damage in a mouse model of diabetic renal injury. *Diabetologia.* 53 1772–1782.

**Lingling G, Yongsheng Z, Lifeng Z, Fengbo H, Jinfan L, Shouli W** (2016) MicroRNAs, TGF- $\beta$  signaling, and the inflammatory microenvironment in cancer. *Tumour Biol.* 37(1): 115–125.

**Loeffler I, Wolf G.** (2015). Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Diabetic Nephropathy: Fact or Fiction? *Cells.* 4 (4):631-52.

**Long J, Wang Y, Wang W, Chang BH, Danesh FR.** (2011). MicroRNA-29c is a signature microRNA under high glucose conditions that targets Sprouty homolog 1, and its in vivo knockdown prevents progression of diabetic nephropathy. *J. Biol. Chem.* 286, 11837–11848.

**Lorenzen JM, Haller H, Thum T** (2011). MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 7(5):286- 94.

**Luciano DJ, Mirsky H, Vendetti NJ, Maas S.** (2004). RNA editing of a miRNA precursor. *RNA.* 10 (8):1174-7.

**Luo D, Guan Q, Wang K, Nguan CY, Du C** (2017). TGF- $\beta$ 1 stimulates movement of renal proximal tubular epithelial cells in a three-dimensional cell culture via an autocrine TGF- $\beta$ 2 production. *Exp Cell Res.* 350(1):132-139.

- Ma PF, Gao CC, Yi J, Zhao JL, Liang SQ, Zhao Y, Ye YC, Bai J, Zheng QJ, Dou KF, Han H, Qin HY.** (2017). Cytotherapy with M1-polarized macrophages ameliorates liver fibrosis by modulating immune microenvironment in mice. *J Hepatol.* [Epub ahead of print]
- Maarouf OH, Aravamudhan A, Rangarajan D, Kusaba T, Zhang V, Welborn J, Gauvin D, Hou X, Kramann R, Humphreys BD.** (2015). Paracrine Wnt1 Drives Interstitial Fibrosis without Inflammation by Tubulointerstitial Cross-Talk. *J Am Soc Nephrol* 27(3):781-90.
- Metzinger-Le Meuth V, Burtsey S, Maitrias P, Massy ZA, Metzinger L.** (2016). microRNAs in the pathophysiology of CKD-MBD: Biomarkers and innovative drugs. *Biochim Biophys Acta.* 1863(1):337-345.
- Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J.** (2001). Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension.* 38 (3 Pt 2):635-8.
- Mezzano Sergio A, Aros EC.** (2005). Chronic kidney disease: Classification, mechanisms of progression and strategies for renoprotection. *Rev Méd Chile;* 133(3): 338-348.
- Mian C, Pennelli G, Fassan M, Balistreri M, Barollo S, Cavedon E, Galuppini F, Pizzi M, Vianello F, Pelizzo MR, Girelli ME, Rugge M, Opocher G** (2012). MicroRNA profiles in familial and sporadic medullary thyroid carcinoma: preliminary relationships with RET status and outcome. *Thyroid.* 22(9):890-6.
- Miele L, Golde T, Osborne B.** (2006). Notch signaling in cancer. *Curr. Mol. Med.* 6:905–918.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M.** (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 10513–10518.
- Murray PT, Mehta RL., Shaw A, Ronco C, Endre Z, Kellum JA., Chawla L, Cruz D, Ince C, Okusa M.** (2014). Current Use of Biomarkers in Acute Kidney Injury: Report and Summary of Recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative Consensus Conference. *Kidney Int* 85(3): 513–521.
- Nakamoto T, Yamagata T, Sakai R, Ogawa S, Honda H, Ueno H, Hirano N, Yazaki Y, Hirai H.** (2000). ClZ, a zinc finger protein that interacts with p130 (cas) and activates the expression of matrix metalloproteinases. *Mol. Cell Biol.* 20: 1649-1658.
- National Kidney Foundation.** (2002). K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis.* 39(2 Suppl 1):S1-266.

**National Kidney Foundation.** (2013). KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Volume 3. Issue 1.

National Kidney Foundation. <https://www.kidney.org/kidneydisease/aboutckd>

**Nawshad A, Hay ED.** (2003). TGFbeta3 signaling activates transcription of the LEF1 gene to induce epithelial mesenchymal transformation during mouse palate development. *J Cell Biol.* 163 (6):1291-301.

**Neal CS, Michael MZ, Pimlott LK, Yong TY, Li JY, Gleadle JM.** (2011). Circulating microRNA expression is reduced in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 26 (11):3794-802.

**Neelisetty S, Alford C, Reynolds K, Woodbury L, Nlandu-Khodo S, Yang H, Fogo AB, Hao CM, Harris RC, Zent R, Gewin L.** (2015). Renal fibrosis is not reduced by blocking transforming growth factor- $\beta$  signaling in matrix-producing interstitial cells. *Kidney International* 88: 503–514.

**Neilsen CT, Goodall GJ, Bracken CP.** (2012). IsomiRs – the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends Genet.* 28: 544 – 9.

**Orozco BR** (2010). Recognition and prevention of chronic kidney disease (CKD). *Revista Médica Clínica Las Condes.* 21 (5): 779–789.

**Otero A, de Francisco A, Gayoso P, Garcia F;** on behalf of the EPIRCE Study Group. (2010). Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrología.* 30(1):78-86

**Pallet N, Bouvier N, Bendjallabah A, Rabant M, Flinois JP, Hertig A, Legendre C, Beaune P, Thervet E, Anglicheau D.** (2008). Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am J Transplant.* 8 (11):2283-96.

**Pan C, Chen H, Wang L, Yang S, Fu H, Zheng Y, Miao M, Jiao B.** (2012). Down-regulation of MiR-127 facilitates hepatocyte proliferation during rat liver regeneration. *PLoS ONE.* 7:e39151.

**Paroo Z, Ye X, Chen S, Liu Q.** (2009). Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell.* 139: 112 – 22.

**Patel V, Noureddine L** (2012). MicroRNAs and fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 21(4): 410 –416.

**Peinado H, Portillo F, Cano A.** (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol.*; 48(5-6):365-75.

- Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R.** (2008). The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer*. 99(9): 1375–1379.
- Puente XS, Sánchez LM, Gutiérrez-Fernández A, Velasco G, López-Otín C.** (2005). A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 331-334.
- Putta S , Lanting L, Sun G, Lawson G, Kato M, Natarajan R.** (2012). Inhibiting microRNA-192 ameliorates renal fibrosis in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23(3): 458–469.
- Qin W, Chung AC, Huang XR, Meng XM, Hui DS, Yu CM, Sung JJ, Lan HY** (2011). TGF- $\beta$ /Smad3 Signaling Promotes Renal Fibrosis by Inhibiting miR-29. *Am Soc Nephrol.* 22: 1462– 1474.
- Radisky ES, Radisky DC.** (2010). Matrix Metalloproteinase-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 15(2): 201–212.
- Rahayu P, Agustina L, Tjandrawinata RR.** (2017). Tacorin, an extract from *Ananas comosus* stem, stimulates wound healing by modulating the expression of tumor necrosis factor  $\alpha$ , transforming growth factor  $\beta$  and matrix metalloproteinase 2. *FEBS Open Bio.* 7(7):1017-1025.
- Rajić J, Inic-Kanada A, Stein E, Dinić S, Schuerer N, Uskoković A, Ghasemian E, Mihailović M, Vidaković M, Grdović N, Barisani-Asenbauer T.** (2017) Chlamydia trachomatis Infection Is Associated with E-Cadherin Promoter Methylation, Downregulation of E-Cadherin Expression, and Increased Expression of Fibronectin and  $\alpha$ -SMA-Implications for Epithelial-Mesenchymal Transition. *Front Cell Infect Microbiol.* 7:253.
- Ramachandran K, Saikumar J, Bijol V, Koyner JL, Qian J, Betensky RA, Waikar SS, Vaidya VS.** (2013). Human miRNome profiling identifies microRNAs differentially present in the urine after kidney injury. *Clin Chem.* 59(12).
- Ramos Abraham C, Becerril Berrocal C, Cisneros Lira JG., Montaña Ramírez M.** (2004). El miofibroblasto, una célula multifuncional en la patología pulmonar. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx.* 17(3):215-231.
- Rateitschak K, Kaderali L, Wolkenhauer O, Jaster R.** (2016). Autocrine TGF- $\beta$ /ZEB/microRNA-200 signal transduction drives epithelial-mesenchymal transition: Kinetic models predict minimal drug dose to inhibit metastasis. *Cell Signal.* 28(8):861-70.
- Roberts AB, Wakefield LM.** (2003) The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:8621–8623.

- Ronco P, Chatziantoniou C.** (2008). Matrix metalloproteinases and matrix receptors in progression and reversal of kidney disease: therapeutic perspectives. *Kidney Int.* 74: 873–878.
- Rybak A, Fuchs H, Hadian K, Smirnova L, Wulczyn EA, Michel G, Nitsch R, Krappmann D, Wulczyn FG.** (2009). The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nature Cell Biol.* 11, 1411–1420.
- Saikumar J, Ramachandran K, Vaidya VS.** (2014). Non invasive Micromarkers. *Clin Chem.* 60(9): 1158–1173.
- Sakamaki Y, Sasamura H, Hayashi K, Ishiguro K, Takaishi H, Okada Y, D, Armiento JM, Saruta T, Itoh H.** (2010). Absence of gelatinase (MMP-9) or collagenase (MMP-13) attenuates adriamycin-induced albuminuria and glomerulosclerosis. *Nephron Exp Nephrol.* 115 (2):e22-32.
- Scadden AD.** (2005). The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nat Struct Mol Biol.* 12: 489 – 96.
- Schnaper HW.** (2017). The Tubulointerstitial Pathophysiology of Progressive Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 24(2):107-116.
- Schultz NA, Dehlendorff C, Jensen BV, Bjerregaard JK, Nielsen KR, Bojesen SE, Calatayud D, Nielsen SE, Yilmaz M, Holländer NH, Andersen KK, Johansen JS.** (2014). MicroRNA biomarkers in whole blood for detection of pancreatic cancer. *JAMA.* 2014 Jan 22-29; 311(4):392-404.
- Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K.** (2014). Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11: 145–156.
- Seijas M, Baccino C, Nin N, Lorente JA** (2014). Definition and biomarkers of acute renal damage: new perspectives. *Med Intensiva.* 38(6):376-85.
- Seo HH, Lee SY, Lee CY, Kim R, Kim P, Oh S, Lee H, Lee MY, Kim J, Kim LK, Hwang KC, Chang W.** (2017) Exogenous miRNA-146a Enhances the Therapeutic Efficacy of Human Mesenchymal Stem Cells by Increasing Vascular Endothelial Growth Factor Secretion in the Ischemia/Reperfusion-Injured Heart. *J Vasc Res.* 54(2):100-108.
- Shi L, Wang Y, Lu Z, Zhang H, Zhuang N, Wang B, Song Z, Chen G, Huang C, Xu D, Zhang Y, Zhang W, Gao Y.** (2017). miR-127 promotes EMT and stem-like traits in lung cancer through a feed-forward regulatory loop. *Oncogene.* 36 (12):1631-1643.

**Shobeiri N, Adams MA, Holden RM.** (2010). Vascular calcification in animal models of CKD: A review. *Am J Nephrol.* 31(6):471-81.

**Shyh-Chang N, Daley GQ.** (2013). Lin28: primal regulator of growth and metabolism in stem cells. *Cell Stem Cell.* 12: 395 – 406.

**Slaby O, Redova M, Poprach A, Nekvindova J, Iliev R, Radova L, Lakomy R, Svoboda M, Vyzula R.** (2012). Identification of MicroRNAs associated with early relapse after nephrectomy in renal cell carcinoma patients. *Genes Chromosomes Cancer.* 51(7):707-16.

**Smith AL, Iwanaga R, Drasin DJ, Micalizzi DS, Vartuli RL, Tan AC, Ford HL.** (2012). The miR-106b-25 cluster targets SMAD7, activates TGF- $\beta$  signaling, and induces EMT and tumor initiating cell characteristics downstream of Six1 in human breast cancer. *Oncogene.* 31: 5162–71.

**Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nicleleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M.** (2008). Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant.* 8(4):753-60.

**Sonar SA, Shaikh S, Joshi N, Atre AN, Lal G.** (2017). IFN- $\gamma$  promotes transendothelial migration of CD4+ T cells across the blood-brain barrier. *Immunol Cell Biol.* [Epub ahead of print]

**Stevens LA, Coresh J, Feldman HI, Greene T, Lash JP, Nelson RG** (2007). Evaluation of the modification of diet in renal disease study equation in a large diverse population. *J Am Soc Nephrol.* 18:2749-57.

**Suárez Y, Sessa WC.** (2009). microRNAs as novel regulators of angiogenesis. *Circ Res.* 104(4): 442–454.

**Subdirección general de calidad y cohesión. Dirección general de salud pública, Calidad e innovación. Ministerio de sanidad servicios sociales e igualdad. Consejerías de sanidad de las CCAA.** (2015). *Documento marco sobre Enfermedad Renal Crónica (ERC) dentro de la estrategia de abordaje a la cronicidad en el SNS.*

**Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ.** (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science.* 339 (6121):786-91.

**Sun YB, Qu X, Caruana G, Li J.** (2016). The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis. *Differentiation.* 92(3):102-107.



**Taipale J, Beachy PA.** (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*. 411(6835):349-54.

**Taiyab A, Korol A, Deschamps PA, West-Mays JA.** (2016).  $\beta$ -Catenin/CBP-Dependent Signaling Regulates TGF- $\beta$ -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition of Lens Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 57 (13):5736-5747.

**Tan TK, Zheng G, Hsu TT, Lee SR, Zhang J, Zhao Y, Tian X, Wang Y, Wang YM, Cao Q, Wang Y, Lee VW, Wang C, Zheng D, Alexander SI, Thompson E, Harris DC.** (2013). Matrix metalloproteinase-9 of tubular and macrophage origin contributes to the pathogenesis of renal fibrosis via macrophage recruitment through osteopontin cleavage. *Lab Invest*. 93:434–449.

**Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA.** (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3: 349-363.

**Trionfini P, Benigni A, Remuzzi G.** (2015). MicroRNAs in kidney physiology and disease. *Nat Rev Nephrol*. 11 (1):23-33.

**van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN** (2008) Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13027–13032

**Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, Tulchinsky E, Van Roy F, Berx G.** (2005). SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res*. 33 (20):6566-78.

**Vega G, Alarcón S, San Martín R.** (2016). The cellular and signalling alterations conducted by TGF- $\beta$  contributing to renal fibrosis. *Cytokine*. 88: 115–125.

**Verma RP, Hansch C** (2007). Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q) SARs. *Bioorg Med Chem*. 15(6):2223-68.

**Vesely C, Tauber S, Sedlazeck FJ, von Haeseler A, Jantsch MF.** (2012). Adenosine deaminases that act on RNA induce reproducible changes in abundance and sequence of embryonic miRNAs. *Genome Res*. 22: 1468 – 76.

**Vishal S. Vaidya, Michael A. Ferguson, Joseph V. Bonventre** (2008) Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 48: 463–493.

**Wang B, Komers R, Carew R, Winbanks CE, Xu B, Herman-Edelstein M, Koh P, Thomas M, Jandeleit-Dahm K, Gregorevic P, Cooper ME, Kantharidis P.** (2012). Suppression of

microRNA-29 expression by TGF- $\beta$ 1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23 (2): 252–265.

**Wang B, Yao K, Wise AF, Lau R, Shen HH, Tesch GH, Ricardo SD.** (2017) miR-378 reduces mesangial hypertrophy and kidney tubular fibrosis via MAPK signalling. *Clin Sci (Lond).* 131 (5):411-423.

**Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q.** (2010). Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J.* 31: 659–666.

**Wang JY , Gao YB, Zhang N, Zou DW, Xu LP, Zhu ZY, Li JY, Zhou SN, Cui FQ, Zeng XJ, Geng JG, Yang JK.** (2013). Tongxinluo Ameliorates Renal Structure and Function by Regulating miR-21-induced Epithelial-To-Mesenchymal Transition in Diabetic Nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 306 (5): F486-F495.

**Wang X, Zhou Y, Tan R, Xiong M, He W, Fang L, Wen P, Jiang L, Yang J.** (2010). Mice lacking the matrix metalloproteinase-9 gene reduce renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 299(5): F973- 82.

**Wang Z, Chen Z, Gao Y, Li N, Li B, Tan F, Tan X, Lu N, Sun Y, Sun J, Sun N, He J.** (2011). DNA hypermethylation of microRNA-34b/c has prognostic value for stage non-small cell lung cancer. *Cancer Biol Ther.* 11: 490 – 6.

**Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K.** (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 56:1733–41.

**Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P.** (2017). Chronic Kidney Disease. *Lancet.* 389(10075):1238-1252.

**Wegner W, Burckhardt BC, Burckhardt G, Henjakovic M.** (2012). Male-dominant activation of rat renal organic anion transporter 1 (Oat1) and 3 (Oat3) expression by transcription factor BCL6. *PLoS One.* 7(4):e35556.

**Wiafe B, Adesida A, Churchill T, Adewuyi EE, Li Z, Metcalfe P.** (2017). Hypoxia-increased expression of genes involved in inflammation, dedifferentiation, pro-fibrosis, and extracellular matrix remodeling of human bladder smooth muscle cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 53(1):58-66.

- Wieneke Marleen Michels, Diana Carina Grootendorst, Marion Verduijn, Elise Grace Elliott, Friedo Wilhelm Dekker, Raymond Theodorus Krediet** (2010). Performance of the Cockcroft-Gault, MDRD, and New CKD-EPI Formulas in Relation to GFR, Age, and Body Size. *Clin J Am Soc Nephrol*. 5(6): 1003–1009.
- Wu Y, Song LT, Li JS, Zhu DW, Jiang SY, Deng JY.** (2017) MicroRNA-126 Regulates Inflammatory Cytokine Secretion in Human Gingival Fibroblasts Under High Glucose Via Targeting Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 6. *J Periodontol*. 1-20.
- Xie F, Li X, Wei C, Gou L, Dang Y, Shan Z.** (2015) [Transfected miR-1908 inhibits renal fibrosis via targeting transforming growth factor beta 1. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 31(12):1682-5, 1689.
- Xie T, Liang J, Liu N, Wang Q, Li Y, Noble PW, Jiang D** (2012) MicroRNA-127 inhibits lung inflammation by targeting IgG Fcγ receptor I. *J Immunol*. 188:2437–2444
- Yang P, Zhang Y, Markowitz GJ, Guo X, Wang XF** (2016). TGF-β-Regulated MicroRNAs and Their Function in Cancer Biology. *Methods Mol Biol*. 1344: 325-39.
- Yang Y, Ahn YH, Gibbons DL, Zang Y, Lin W, Thilaganathan N, Alvarez CA, Moreira DC, Creighton CJ, Gregory PA, Goodall GJ, Kurie JM.** (2011). The Notch ligand Jagged2 promotes lung adenocarcinoma metastasis through a miR-200–dependent pathway in mice. *J Clin Invest*. 121(4):1373-1385.
- Yang Z, Zhang Y, Wang L.** (2013). A feedback inhibition between miRNA-127 and TGFβ/c-Jun cascade in HCC cell migration via MMP13. *PLoS One*. 8 (6):e65256.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA.** (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 318(5858):1917-20.
- Yu Q, Stamenkovic I.** (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*. 14 (2):163-76.
- Yu Y, Liu L, Ma R, Gong H, Xu P, Wang C.** (2016). MicroRNA-127 is aberrantly downregulated and acted as a functional tumor suppressor in human pancreatic cancer. *Tumour Biol*. 37(10):14249-14257.
- Yuan J, Ji H, Xiao F, Lin Z, Zhao X, Wang Z, Zhao J, Lu J.** (2016). MicroRNA 340 inhibits the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting JAK1. *Biochem Biophys Res Commun*. pii: S0006-291X (16)32144-1.

- Zeisberg M, Neilson EG.** (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 119 (6):1429-37.
- Zeisberg M, Khurana M, Rao VH, Cosgrove D, Rougier JP, Werner MC, Shield CF 3rd, Werb Z, Kalluri R.** (2006). Stage-specific action of matrix metalloproteinases influences progressive hereditary kidney disease. *PLoS Med*; 3:e100.
- Zhang C, Wang C, Chen X, Yang C, Li K, Wang J, Dai J, Hu Z, Zhou X, Chen L, Zhang Y, Li Y, Qiu H, Xing J, Liang Z, Ren B, Yang C, Zen K, Zhang CY.** (2010). Expression profile of microRNAs in serum: a fingerprint for esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Chem.* 56:1871–1879.
- Zhao Y, Dai Z, Liang Y, Yin M, Ma K, He M, Ouyang H, Teng CB.** (2014). Sequence specific inhibition of microRNA via CRISPR/CRISPRi system. *Sci Rep.* 4:3943.
- Zhao Y, Qiao X, Tan TK, Zhao H, Zhang Y, Liu L, Zhang J, Wang L, Cao Q, Wang Y, Wang Y, Wang YM, Lee VW, Alexander SI, Harris DC, Zheng G.** (2016). Matrix metalloproteinase 9 dependent Notch signaling contributes to kidney fibrosis through peritubularendothelial-mesenchymal transition. *Nephrol Dial Transplant.* 32(5): 781–791.
- Zheng CZ, Shu YB, Luo YL, Luo J.** (2017) The role of miR-146a in modulating TRAF6-induced inflammation during lupus nephritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 21(5):1041-1048.
- Zheng G, Lyons JG, Tan TK, Wang Y, Hsu TT, Min D, Succar L, Rangan GK, Hu M, Henderson BR, Alexander SI, Harris DC.** (2009). Disruption of E-cadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial–mesenchymal transition downstream of transforming growth factor-beta1 in renal tubular epithelial cells. *Am J Pathol.* 175: 580– 591.
- Zhong X, Chung AC, Chen HY, Dong Y, Meng XM, Li R, Yang W, Hou FF, Lan HY.** (2013). miR-21 is a key therapeutic target for renal injury in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 56(3): 663–674.
- Zigrino P, Kuhn I, Bäuerle T, Zamek J, Fox JW, Neumann S, Licht A, Schorpp-Kistner M, Angel P, Mauch C.** (2009). Stromal expression of MMP-13 is required for melanoma invasion and metastasis. *J Invest Dermatol.* 129:2686–2693.
- Zou XZ, Liu T, Gong ZC, Hu CP, Zhang Z.** (2016). MicroRNAs-mediated epithelial-mesenchymal transition in fibrotic diseases. *Eur J Pharmacol.* 796:190-206.

## Anexo 1

**Los resultados descritos en esta tesis han dado lugar a los siguientes manuscritos en redacción:**

1. AUTORES: **Laura Martín-Gómez**, Sara Giménez Moyano, Macarena Rodríguez, Edurne Ramos, Elisa Conde, Konstantinos Stamatakis, Ana Saiz, Elia Aguado-Fraile, Lorena Crespo, M Laura García- Bermejo.

TÍTULO: miR-127 is a protector against renal fibrosis through TEM regulation: MMP13 and Slug as novel miR127 targets

2. AUTORES: **Laura Martín-Gómez**, Sara Giménez Moyano, Macarena Rodríguez, Edurne Ramos, Elisa Conde, Fernando Liaño García, M Laura García- Bermejo.

TÍTULO: miR127 as a novel and useful biomarker in CKD patient's management

**Además se ha contribuido en los siguientes trabajos:**

1. AUTORES: Elisa Conde, Sara Gimenez-Moyano, **Laura Martín-Gómez**, Macarena Rodríguez Serrano, Edurne Ramos, Elia Aguado, Ignacio Blanco-Sánchez, Ana Saiz y María Laura García Bermejo.

TÍTULO: HIF-1 $\alpha$  induction during reperfusion avoid maladaptive repair after renal ischemia/reperfusion.

REVISTA: Sci Rep. 2017 Jan 20; 7: 41099.

2. AUTORES: A. Chiarlone\*, C. Börner, **L. Martín-Gómez**, A. García-Concejo, A. Jiménez-González, M.L. García-Bermejo, R. Rodríguez, I. Galve-Roperh, J. Kraus and M. Guzmán.

TÍTULO: The microrna let-7d is a target of the cb1 cannabinoid receptor and regulates cannabinoid tolerance.

REVISTA: Neuropharmacology. 2016 Sep; 108: 345-52.

3. AUTORES: Elia Aguado-Fraile; Edurne Ramos; Elisa Conde; Macarena Rodriguez-Serrano; **Laura Martín-Gómez**, Aurora Lietor; Angel Candela-Toa; Belen Ponte; Fernando Liaño; María-Laura García-Bermejo.

TÍTULO: A Pilot Study identifying a set of microRNAs as precise diagnostic biomarkers of Acute Kidney Injury.

REVISTA: PLoS ONE. 2015 Jun. 10(6): e0127175

**Presentaciones en congresos internacionales:**

1. AUTORES: Sara Giménez-Moyano, Elisa Conde, Macarena Rodríguez-Serrano, **Laura Martín Gómez**, Edurne Ramos, Eulalia Rodríguez-Martín, Luisa María Villar, María Laura García-Bermejo.

TÍTULO: miR-127 modulates macrophage polarization in renal fibrosis.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación Oral.

CONGRESO: International Congress of Immunology 2016.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Melbourne, Australia

FECHAS: 21-26, Agosto, 2016

2. AUTORES: **Laura Martín-Gómez**, Edurne Ramos, Elisa Conde, Esperanza Macarena Rodríguez Serrano, Sara Gimenez-Moyano, Sara Jimenez Alvaro, Fernando Liaño and Maria Laura Garcia-Bermejo.

TITULO: MiRNAs as novel biomarkers and therapeutic target in Chronic kidney disease.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Poster

CONGRESO: ASN Kidney Week 2015

LUGAR DE CELEBRACIÓN: San Diego, USA

FECHAS: 3-8 Noviembre, 2015

3. AUTORES: Esperanza Macarena Rodriguez Serrano, Cristina Galeano, Edurne Ramos, Elisa Conde, **Laura Martín-Gómez**, Sara Gimenez-Moyano, Fernando Liano and Maria Laura Garcia Bermejo

TITULO: MiRNAs as novel biomarkers for transplanted patient's evolution

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Poster

CONGRESO: ASN Kidney Week 2015

LUGAR DE CELEBRACIÓN: San Diego, USA

FECHAS: 3-8 Noviembre, 2015

#### **Presentación en congresos nacionales:**

1. AUTORES: **Laura Martín-Gómez**, Sara Giménez-Moyano, Elisa Conde, M Edurne Ramos Muñoz, E Macarena Rodríguez, Sara Jiménez-Álvarez, F Liaño and María Laura García Bermejo.

TÍTULO: miR-127 could be a potential novel therapeutic target in chronic kidney disease through modulation of EMT and fibroblasts proliferation.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Poster

CONGRESO: XII Reunión Anual, Sociedad Madrileña de Nefrología

LUGAR DE CELEBRACIÓN: La Granja de San Ildefonso

FECHAS: 11-12 Junio, 2016

2. AUTORES: Sara Giménez-Moyano, Elisa Conde, E Macarena Rodríguez, **Laura Martín Gómez**, M Edurne Ramos-Muñoz, Eulalia Rodríguez-Martín, María Luisa Villar, F Liaño and María Laura García-Bermejo.

TÍTULO: miR-127 as an important mediator in renal fibrosis through macrophages phenotype regulation.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: poster

CONGRESO: XII Reunión Anual, Sociedad Madrileña de Nefrología

LUGAR DE CELEBRACIÓN: La Granja de San Ildefonso.

FECHAS: 11-12 Junio, 2016

3. AUTORES: A. Chiarlone\*, C. Börner, **L. Martín-Gómez**, A. García-Concejo, A. Jiménez-González, M.L. García-Bermejo, R. Rodríguez, I. Galve-Roperh, J. Kraus and M. Guzmán.

TÍTULO: The microRNA let-7d is a target of the CB1 cannabinoid receptor and regulates cannabinoid tolerance

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Poster

CONGRESO: XVI Reunión Anual de la Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Granada, España

FECHAS: 22-25 Septiembre 2015

4. AUTORES: Elia-Aguado Fraile, Edurne Ramos, Elisa Conde, Macarena Rodríguez, **Laura Martín-Gómez**, Sara Giménez-Moyano, Fernando Liaño, Elena Elías Martín, Ángel Candela, M Laura García-Bermejo.

TÍTULO: Serum miRNAs are predictive Biomarkers of Acute Kidney Injury After Cardiac Surgery.



TIPO DE PARTICIPACIÓN: Poster

CONGRESO: XI Reunión de la Sociedad Madrileña de Nefrología

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Alcalá de Henares, España

FECHA: 12 y 13 de Junio de 2015

5. AUTORES: Elia-Aguado Fraile, Edurne Ramos, Elisa Conde, Macarena Rodriguez, **Laura Martín-Gómez**, Sara Giménez-Moyano, Aurora Lietor, Teresa Tenorio, Angel Candela, Fernando Liaño and M Laura García-Bermejo.

TÍTULO: Serum miRNAs are accurate biomarkers of Acute Kidney Injury in ICU patients

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Poster

CONGRESO: XI Reunión de la Sociedad Madrileña de Nefrología

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Alcalá de Henares, España

FECHA: 12 y 13 de Junio de 2015

**Los resultados de esta tesis han servido de base, además, para la solicitud de la siguiente patente europea, que está siendo extendida a PCT:**

Inventores (p.o. de firma): Elisa Conde Moreno, **Laura Martín Gómez**, Sara Gimenez Moyano, Garcia-Bermejo, M. L

Título: miR-127 agents for use in the treatment of renal fibrosis.

Fecha de Prioridad 18/08/2016

Número de la solicitud inicial: European Application16382399.